

Aus dem
Institut für Immunologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Leiter: Prof. Dr. Stefan Bauer

**Die Aktivierung und Funktion von
Bactericidal / Permeability - Increasing Protein (BPI) bei
entzündlichen Darmprozessen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)



Dem Fachbereich der Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Maria Stromiedel
aus Freudenstadt

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich der Philipps-Universität Marburg am: 26.05.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Markus Schnare

1. Korreferent: Prof. Dr. Michael Zemlin

Meinen Kindern

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.1	Das mukosale Immunsystem	2
1.2	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	5
1.3	Dextransulfat (DSS) - Modell	7
1.4	Antimikrobielle Proteine.....	8
1.4.1	Defensine	8
1.4.2	Bactericidal / Permeability - Increasing Protein (BPI)	9
1.5	Zielsetzung.....	11
2	Material	12
2.1	Versuchstiere.....	12
2.2	Zelllinien	12
2.3	Chemikalien und Reagenzien	12
2.4	Kits und Enzyme.....	14
2.5	Antikörper	15
2.6	Oligonukleotide	16
2.7	Stimulanzen.....	17
2.8	Puffer, Medium und Lösungen.....	17
2.8.1	Zellkultivierung	17
2.8.2	Isolation Primärzellen.....	18
2.8.3	MACS-Aufreinigung	18
2.8.4	Agarosegel-Elektrophorese.....	18
2.8.5	Proteinisolation	18
2.8.6	Western Blot	19
2.8.7	ELISA	20
2.8.8	Durchflusszytometrie.....	20
2.9	Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
3	Methoden	23
3.1	Zellbiologische Methoden	23
3.1.1	Zellkultivierung	23
3.1.2	Isolation von murinen Krypten, Epithelzellen und Lamina Propria Lymphozyten	23
3.1.3	MACS-Aufreinigung von B-Zellen.....	24
3.1.4	B-Zell Proliferationsassay	25
3.2	Die Dextransulfat (DSS) induzierte Kolitis	25
3.2.1	Probengewinnung	25

3.3 Molekularbiologische Methoden	26
3.3.1 RNA-Isolation aus Zellkulturen, Primärzellen und Gewebe	26
3.3.2 RNA-Quantifizierung	26
3.3.3 cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase.....	26
3.3.4 Sonden-basierte quantitative Echt-Zeit-PCR (qRT-PCR)	28
3.4 Analytische Methoden	30
3.4.1 Quantifizierung des Proteingehalts	30
3.5 Durchflusszytometrie (FACS)	32
3.6 Mikrobiomanalyse	32
3.6.1 Probengewinnung	33
4 Ergebnisse.....	34
4.1 Expression und Regulation von murinem BPI in Darmepithelzellen.....	34
4.2 Verstärkte BPI-Expression während DSS-induzierter Kolitis.....	38
4.3 BPI-defiziente Mäuse entwickeln eine starke DSS-induzierte Kolitis	38
4.4 BPI hat keinen Einfluss auf die Expression von zytoprotektiven Hitzeschockproteinen.....	43
4.5 Erhöhte Anzahl von Entzündungszellen in BPI ^{-/-} -Mäusen während DSS- induzierter Kolitis	44
4.6 BPI-Defizienz hat keinen Einfluss auf den IL-17C Signalweg	49
4.7 BPI-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Mikroflora	50
5 Diskussion.....	51
5.1 Expression und Regulation von murinem BPI in Darmepithelzellen.....	51
5.2 Verstärkte BPI-Expression während DSS-induzierter Kolitis.....	52
5.3 BPI-defiziente Mäuse entwickeln eine starke DSS-induzierte Kolitis	53
5.4 BPI-Defizienz hat keinen Einfluss auf den IL-17C Signalweg	56
5.5 BPI-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Mikroflora.....	57
5.6 Ausblick	59
6 Zusammenfassung	60
7 Summary	61
8 Abkürzungsverzeichnis	62
9 Abbildungsverzeichnis	65
10 Literaturverzeichnis.....	66

11	Verzeichnis der akademischen Lehrer	75
-----------	--	-----------

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexer Abwehrmechanismus des menschlichen Körpers gegen Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten, welche zum Teil lebensbedrohliche Infektionen verursachen können.

Bei höheren Vertebraten unterscheidet man die angeborene von der adaptiven Immunität (Kawai et al., 2006). Beide Systeme besitzen sowohl zelluläre (u.a. Granulozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen, T- und B-Zellen) als auch humorale (u.a. Komplementsystem, antimikrobielle Proteine, Interleukine, Antikörper) Komponenten.

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene dar, wenn diese die physikalischen Schutzbarrieren des Körpers überwunden haben. Einer der ersten Abwehrmechanismen nach einer Infektion ist die Immunabwehr von Pathogenen durch Phagozytose. Unter anderem spielen dabei Makrophagen eine wichtige Rolle, da sie verschiedenste Erreger erkennen und über rezeptorvermittelte Aufnahme im Phagosom eliminieren können. Dabei werden charakteristische Strukturen der Pathogene über bestimmte Rezeptoren, die sogenannten *pattern recognition receptors* (PRRs), erkannt. Zu diesen mikrobiellen Strukturen, den Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*pathogen associated molecular patterns*; PAMPs), zählen u.a. bakterielles Flagellin, mannosereiche Oligosaccharide, Lipoteichonsäure (LTA), Lipopolysaccharide (LPS) und Peptidoglykan (PG) aus der Zellwand von Bakterien. Aufgrund dieser PAMPs ist das angeborene Immunsystem in der Lage, zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ zu unterscheiden (Medzhitov et al., 2000). Neben Makrophagen zählen auch dendritische Zellen (DC) und B-Zellen zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Die APCs sind in der Lage, Komponenten von Pathogenen, sogenannte Antigene auf ihrer Zelloberfläche mittels *major histocompatibility complex* (MHC)-Molekülen den naiven T-Zellen des adaptiven Immunsystems zu präsentieren. Zusätzlich zu den Makrophagen und DCs weisen auch neutrophile Granulozyten phagozytierende Eigenschaften auf. Die Aktivierung dieser phagozytierenden Zellen löst dabei unter anderem die Freisetzung verschiedener Zytokine und Mediatoren aus, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen.

Allein die angeborene Immunität reicht nicht immer aus, um dem Körper einen

ausreichenden immunologischen Schutz zu bieten. Als effektiverer und deutlich zielgerichteter Mechanismus im Vergleich zum angeborenen Immunsystem hat sich das adaptive Immunsystem evolutionärgeschichtlich aus dem angeborenen entwickelt. Es ist in der Lage, eine Vielzahl von Antigenen sehr spezifisch zu erkennen und ein immunologisches Gedächtnis auszubilden (Janeway et al., 2002). Das adaptive Immunsystem bildet nach dem Erstkontakt antigenspezifische Gedächtniszellen aus. Dadurch ist es in der Lage, bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen schnell und effizient zu reagieren. Die Folge ist eine meist lebenslange Immunität gegen das Pathogen. Zu den Hauptkomponenten gehören B- und T-Lymphozyten, die auf ihrer Oberfläche antigenspezifische Rezeptoren tragen (Kawai et al., 2006). Die Rezeptoren werden durch zufällige somatische Rekombination variabler Gensegmente zusammengesetzt, was dem Organismus ermöglicht, auf eine große Zahl von Pathogenen mit einer hohen Spezifität zu reagieren (Pone et al., 2012). So erkennen T-Zellen Peptide von Pathogenen über ihren hochvariablen T-Zell-Rezeptor (TCR) nur dann, wenn diese gebunden an MHC-Molekülen (MHC-Klasse I oder MHC-Klasse II) präsentiert werden (Douglas et al., 2011). Eine zentrale Aufgabe der T-Zellen besteht darin, infizierte Zellen zu identifizieren und zu zerstören. Diese Funktion übernehmen die zytotoxischen T-Zellen. Eine weitere wichtige Gruppe der T-Lymphozyten stellen T-Helferzellen dar. Neben der klassischen Einteilung in Th1- und Th2-Zellen aufgrund ihrer sezernierten Zytokine, können T-Helferzellen auch in Th17-Zellen differenzieren. Diese Zellpopulation ist in der Lage, IL-17 zu produzieren und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort an epithelialen und mukosalen Barrieren. Die B-Zellen dahingegen sind für die humorale Immunantwort zuständig. Sie sind in der Lage, Immunglobuline zu produzieren, mit der Funktion Pathogene zu neutralisieren oder zu opsonisieren (Janeway et al., 2002).

1.1.1 Das mukosale Immunsystem

Der Gastrointestinaltrakt stellt die größte Grenzfläche zwischen Organismus und Umwelt dar. Durch die tägliche Nahrungsaufnahme steht der Organismus im ständigen Kontakt mit einer Vielzahl von Antigenen, die potentiell gefährlich sein können. Aus diesem Grunde hat sich das mukosale Immunsystem als nahezu eigenständiger Teil des Immunsystems entwickelt (Abb. 1-1). Die Herausforderung des mukosalen Immunsystems besteht darin, ein Gleichgewicht zwischen Toleranz gegenüber nicht-

Pathogenen und der Immunantwort gegenüber Pathogenen aufzubauen (Baumgart et al., 2002). Zur Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts haben sich im Laufe der Entwicklung verschiedene Barrieren des mukosalen Immunsystems entwickelt: Die mechanische Barriere, unspezifische Abwehrmechanismen und das darmassoziierte lymphatische Gewebe (*gut associated lymphoid tissue*, GALT) (Mayer, 2005).

Die erste Barriere gegenüber intestinalen Bakterien stellt die Epithelschicht dar, in der verschiedenste Zelltypen eingebettet sind. Durch stark adhäsive Zell-Zell-Kontakte, die *tight-junctions*, wird ein erstes Durchdringen auch von kleinsten Partikeln verhindert. Von den Becher-Zellen, die in der Epithelzellschicht eingelagert sind, wird eine Schleimschicht aus Glykoproteinen sezerniert. Diese Mukusschicht bildet eine semi-permeable Barriere, die den direkten Kontakt zwischen Bakterien und den Epithelzellen minimiert (Sansonetti, 2004). Neben dem bakteriziden Lysozym enthält der Mukus von Plasmazellen produziertes sekretorisches Immunglobulin A. Dies ist in der Lage, Antigene zu binden, zu neutralisieren und somit die Aufnahme in die Darmmukosa zu verhindern (Benckert et al., 2011). Unspezifische Abwehrmechanismen kommen zum Einsatz, wenn Pathogene die erste Schutzschicht überwinden konnten. Zu diesem Zweck sind die Epithelzellen in der Lage, antimikrobielle Proteine, wie Defensine oder Cathelicidine, zu sezernieren (Artis, 2008; Kamdar et al., 2013). Eine weitere bedeutende Rolle zur Aufrechterhaltung der Toleranz spielt das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT). Das GALT wird in Effektor- und Induktionsregion eingeteilt. Die Effektorregion besteht aus den Lymphozyten, welche im Epithel und der Lamina Propria diffus verteilt sind. Durch die organisierten lymphatischen Gewebe der Payerschen Platten, mesenterialen Lymphknoten und Lymphfollikel erfolgt die Induktion der Immunantwort (Mowat, 2003). Diese Induktionsregion ist reich an Antigen-präsentierenden Zellen, T-Zellen und B-Zellen.

Die Aufnahme von Antigenen erfolgt über die mukosale Barriere durch spezialisierte M-Zellen oder den Antigen-präsentierenden Zellen der Lamina Propria, wodurch sie nach Endozytose zu den Payerschen Platten gelangen. Dadurch werden T- und B-Zellen aktiviert und die spezifische Immunantwort initiiert (Mowat, 2003; Magalhaes et al., 2007).

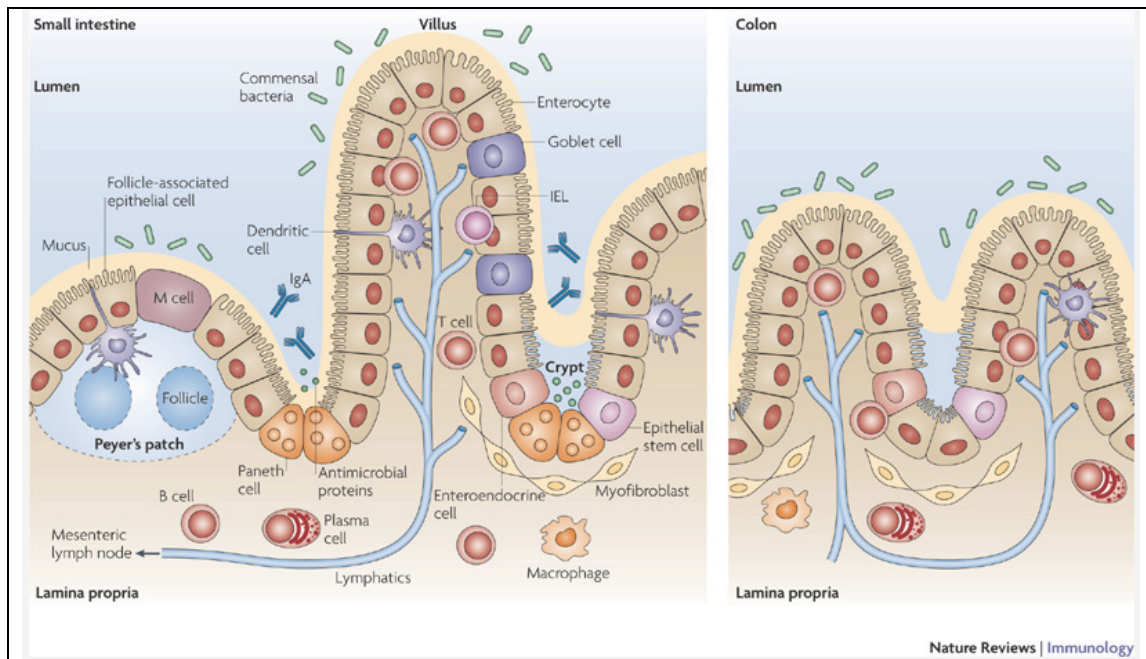
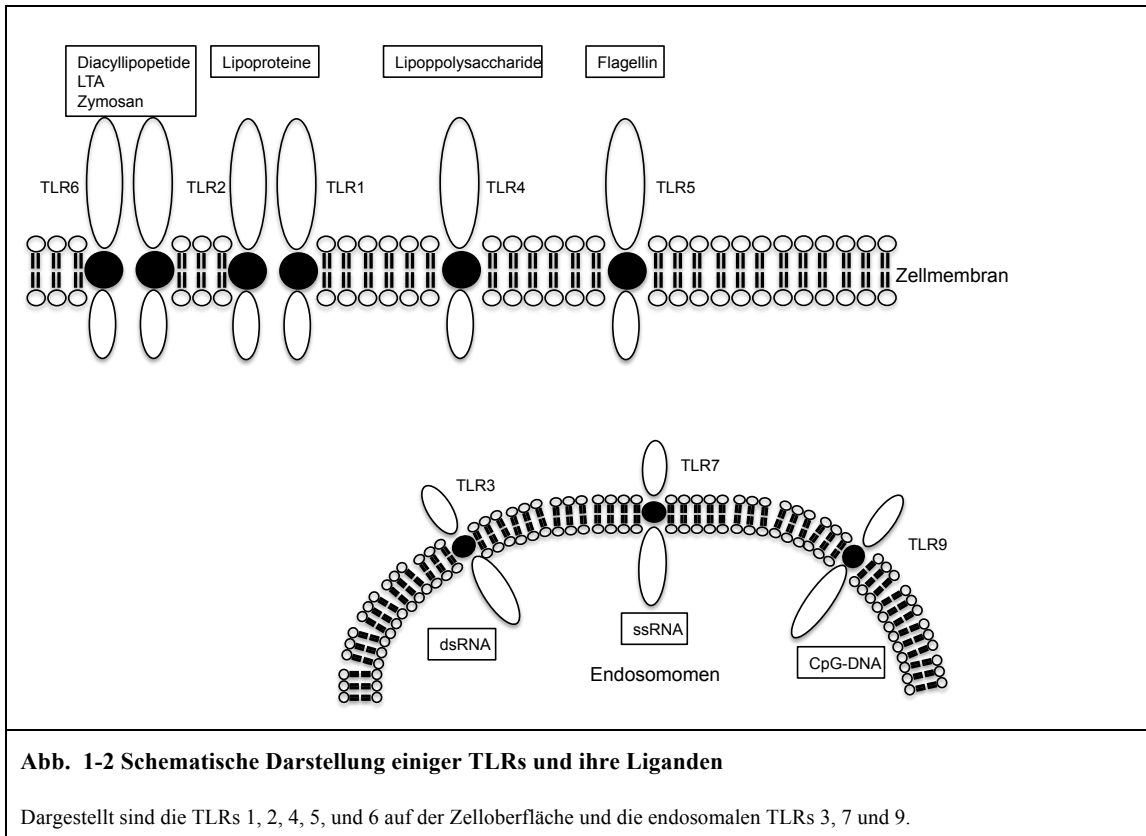


Abb. 1-1 Schematische Darstellung des mukosalen Immunsystems (Abreu, 2010)

Sowohl die Epithelzellen als auch die immunkompetenten Zellen des GALT können die charakteristischen PAMPs der Mikroorganismen über spezifische Rezeptoren (PRRs) erkennen. Dabei haben zwei Rezeptortypen eine entscheidende Bedeutung: Die Toll-like Rezeptoren (TLRs) und die Nukleotid-bindende Oligomerisations-Domäne (NOD)-ähnlichen Rezeptoren (NLR) (MacDonald et al., 2005). Die TLRs sind Transmembranrezeptoren, die auf verschiedenen Immunzellen und auch Epithelzellen entlang des Intestinaltrakts zu finden sind (Kamdar et al., 2013). Es konnten bis lang 10 humane (TLR1-10) und 12 murine (TLR1-9, TLR11-13) TLRs identifiziert werden (O'Neill, 2006). Sie werden entweder auf der Zelloberfläche exprimiert oder sind intrazellulär in endosomalen Vesikeln lokalisiert (Takeda et al., 2005). Jeder TLR ist in der Lage, spezifische bakterielle Komponenten zu erkennen (Abb. 1-2).



Bei den NLRs handelt es sich um intrazelluläre Rezeptoren, wobei NOD1 und NOD2 am besten charakterisiert sind. Sie sind in der Lage, Muropeptide des Peptidoglykans zu erkennen (Werts et al., 2011; Fukata et al., 2009; Wells et al., 2010). Durch die spezifische Antigenerkennung und Induktion der Sekretion von pro- und antiinflammatorischen Zyto- und Chemokinen über die NF- κ B- Signalkaskade, tragen TLRs und NLRs entscheidend zur Erhaltung des Gleichgewicht zwischen Toleranz gegenüber nicht-Pathogenen und Immunantwort gegenüber Pathogenen bei (Sansone et al., 2004; Tlaskalová-Hogenová et al., 2004).

1.2 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) stellen chronische, rezidivierende Entzündungen des Intestinaltrakts dar. Zu den häufigsten Vertretern zählen Morbus Crohn und *Colitis ulcerosa* (Podolksy, 2002). Die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen an Morbus Crohn liegt in Europa bei vier bis sieben und *Colitis ulcerosa* bei neun bis zwölf Personen pro 100.000 Einwohner. Das Alter der Erstmanifestation beider chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (DCCV e.V.).

Ein Merkmal chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen ist die unkontrollierte Entzündung, die entweder den gesamten Verdauungstrakt (Morbus Crohn) oder nur das Colon (*Colitis ulcerosa*) betreffen kann. Beide Erkrankungen sind durch Entzündungen der Mukosa, Rektalblutung, Diarrhoe, Gewichtsverlust und abdominale Schmerzen gekennzeichnet (Papadakis et al., 1999). Die Pathogenese und Ätiologie bleibt trotz zahlreicher Studien und Erkenntnisse über Krankheitsursachen und -verlauf weitestgehend ungeklärt. Es wird jedoch ein multimodales Zusammenspiel von Mikroflora sowie immunologischen, genetischen und Umweltfaktoren angenommen (Podolsky, 2002; Scaldaferri et al., 2007).

Bei zahlreichen genetischen Studien konnten 99 Suszeptibilitätsloci für CED identifiziert werden, einige spezifisch mit Morbus Crohn oder *Colitis ulcerosa*, andere mit beiden CED assoziiert (Lees et al., 2011). Diese Suszeptibilitätsgene steuern vor allem biologische Prozesse wie Regulation des angeborenen und adaptiven Immunsystems, epitheliale Barriere und Wundheilung, Autophagie, Generierung von ROS (*reactive oxygen species*) und mikrobielle Abwehr (Khor et al., 2001). So konnte z.B. bei Patienten mit Morbus Crohn Mutationen in dem NOD2/CARD15 (*nucleotide binding oligomerization domain 2 / caspase recruiting domain 15*) Gen nachgewiesen werden. NOD2 spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenerkennung und aktiviert den NF-κB-Signalweg, was zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen führt. Durch die nachgewiesenen Mutationen ist NOD2 nicht mehr funktional und somit nicht in der Lage, ein intrazelluläres Signal zu induzieren (Ogura et al., 2001; Kobayashi et al., 2002). Des Weiteren kommt es dadurch in den Paneth-Zellen zu einer verringerten Expression antimikrobieller Peptide und verzögerten Eliminierung von Pathogenen. Durch die erhöhte Bakterienlast wird das Epithel gestört und die Darmbarriere kann durchbrochen werden, was eine starke Inflammation zur Folge hat (Wehkamp et al., 2005; Salzman et al., 2007).

Neben dem genetischen Aspekt wird auch eine Dysregulation der intestinalen Mikrobiota und des Immunsystems als Ätiologie von CED angenommen. Der Gastrointestinaltrakt beherbergt über 500 verschiedene Bakterienarten und die Zusammensetzung und Keimzahl variiert zwischen den einzelnen Segmenten, wobei das Colon mit 10^{11} - 10^{12} CFU/g am stärksten besiedelt ist (Isolauri et al., 2004). Hauptsächlich lassen sich fünf dominante Bakterienordnungen nachweisen: *Bacteroidales*, *Bifidobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridiales* und *Lactobacillales*. Bei mehr als 90 % der Mikroflora handelt es sich um obligate

Anaerobier, die fakultativ anaeroben Enterobakterien, wie z.B. *E. coli*, bilden dahingegen nur einen geringen Anteil der gesunden Darmflora (Donskey et al., 2003). Das Immunsystem des Darms ist somit bereits unter normalen physiologischen Bedingungen einer Vielzahl von Mikroorganismen ausgesetzt. Bei Patienten mit CED ist die Zusammensetzung der Mikroflora gestört. So kann man weniger kommensale Bakterien nachweisen, da diese durch die Bildung von Antikörpern reduziert werden (Chassing et al., 2001).

Auch Umweltfaktoren wie Rauchen, Hygienestandard, Stress und Ernährung stellen Risikofaktoren für CED dar. So wird beschrieben, dass Rauchen das Risiko, an Morbus Crohn zu erkranken, erhöht. Bei einer *Colitis ulcerosa* hingegen zeigt sich ein protektiver Effekt des Rauchens (Fiocchi, 1998).

Hitzeschockproteine (Hsp) können durch ihre protektive Eigenschaft möglicherweise auch an dem Verlauf von CED beteiligt sein. Sie sind unter anderem an vielen regulatorischen Signalwegen beteiligt. Zum Beispiel unterstützen Hsp die korrekte Faltung von Proteinen, schützen Peptide vor Denaturierung und assistieren den Transport, die Sekretion und Regulation anderer Proteine (Becker et al., 1994; Feder et al., 1999). Neben Hyperthermie sind viele weitere Stressfaktoren bekannt, die die Transkription von Hitzeschockproteinen induzieren: Z.B. Hypoxie, Sauerstoff- und Stickstoffradikale, Virusinfektionen, und TNF- α (Kregel, 2002). Bei Patienten mit CED konnte in der Darmmukosa und -epithel eine gesteigerte Konzentration von Hsp70 nachgewiesen werden. Auf Grund dessen könnte Hsp70 auch bei CED eine protektive Rolle übernehmen (Ludwig et al., 1999).

1.3 Dextransulfat (DSS) - Modell

Es gibt zahlreiche experimentelle Tiermodelle, um chronisch-entzündliche Darmerkrankungen zu untersuchen. Im Wesentlichen unterscheiden sich diese in der verwendeten Spezies sowie in der krankheitsauslösenden Substanz.

Das Dextransulfat (DSS) - Modell, welches erstmals von Okuyasu et al. beschrieben wurde, ähnelt dem Verlauf einer humanen CED (Okuyasu et al., 1990). Mittels relativ einfacher Versuchsbedingungen und geringem Kostenaufwand bietet das Modell die Möglichkeit, Pathogenese, Pathologie sowie neue Therapieansätze von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen aufzuklären. Durch Veresterung von Dextran, einem Polysaccharid bakterieller Herkunft, mit Chlorschwefelsäure entsteht das Natriumsalz Dextransulfat. Der Schwefelanteil beträgt etwa 17 %, was 1,9 Sulfatgruppen pro

Glykosylrest entspricht (Solomon et al., 2010). Die hohe Wasserlöslichkeit ermöglicht die Induktion einer Kolitis durch Gabe der Substanz im Trinkwasser. Dabei ist die Ausprägung und Lokalisation der Entzündung abhängig von der Konzentration, dem Molekulargewicht und der Verabreichungsdauer des Dextransulfats. Der Mechanismus wie DSS eine Kolitis induziert, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Möglicherweise hat Dextransulfat einen direkten Einfluss auf die Epithelzellen der Darmschleimhaut. So konnte gezeigt werden, dass *tight junction* Proteine nach DSS-Gabe reduziert waren und noch vor Auftreten einer Entzündung die Permeabilität des Epithels erhöht war (Kitajima et al., 2000). Ein weiterer Mechanismus könnte die direkte Zytotoxizität des Dextransulfats auf die Epithelzellen der Mukosa sein (Ni et al., 1996).

Der Verlauf einer DSS-induzierten Kolitis zeigt sich durch histologische Veränderungen im Darm und verschiedene klinischen Zeichen, welche denen von Patienten mit CED ähneln. So weisen die Versuchstiere Verkürzungen des Colons, Einwanderung von Entzündungszellen und Dysplasien auf. Des Weiteren kann man Diarrhoe, Blutablagerungen im Stuhl und einen Gewichtsverlust der Tiere beobachten (Solomon et al., 2010).

1.4 Antimikrobielle Proteine

Antimikrobielle Proteine (AMPs) stellen wichtige Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems dar. Sie lassen sich in vielen Zell- und Gewebetypen von Vertebraten, Invertebraten und Pflanzen nachweisen (Brogdan, 2005).

AMPs sind kleine Polypeptide (<100AS), die entsprechend ihrer Ladung, Aminosäurezusammensetzung und Faltung in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können. Der antimikrobielle Effekt beruht auf dem kationischen Charakter und der amphipathischen Struktur. Die positiv geladenen AMPs binden an die negativ-geladenen Zellwandbestandteilen der Bakterien, was zur Zerstörung ihrer Membran führt (Brogden, 2005; Cederlund et al., 2011).

1.4.1 Defensine

Die Gruppe der Defensine spielt bei der Immunabwehr im Darm eine wichtige Rolle. Sie werden sowohl von den Paneth-Zellen, Epithelzellen als auch neutrophilen Granulozyten (nicht in der Maus) exprimiert (Samantha et al., 2013). Defensine sind in der Lage, neben Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien auch Pilze, Viren und

Protozoen zu eliminieren. Zusätzlich zu ihrer antimikrobiellen Eigenschaft können sie auch als Modulatoren des Immunsystems fungieren. So induzieren sie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, steigern die Phagozytoserate und wirken als Chemokine von Neutrophilen. Aufgrund ihrer Struktur werden Defensine in α -, β - und θ -Defensine unterteilt, wobei θ -Defensine weder im Menschen noch in der Maus exprimiert werden. Sowohl α - als auch β -Defensine werden als Vorläufer synthetisiert und proteolytisch in ihre aktive Form gepalten (Cederlund et al., 2011). Die Synthese der Defensine findet hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten, Paneth- und Epithelzellen statt.

Zwei von den bisher sechs identifizierten α -Defensine im Menschen, HD-5 und HD-6, werden in den Paneth-Zellen exprimiert. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der mukosalen Barriere (Salzmann et al., 2007; Wehkamp et al., 2005a). Dabei sind sie in der Lage, die bakterielle Flora im Dünndarm zu regulieren und somit die Invasion pathogener Keime zu verhindern (Ayabe et al., 2000). Bei Patienten mit Morbus Crohn konnte eine deutlich verminderte Expression von HD-5 und HD-6 in den Paneth-Zellen nachgewiesen werden (Wehkamp et al., 2005b). In der Maus werden die α -Defensine als Cryptdine bezeichnet.

β -Defensine werden hauptsächlich in den Epithelzellen der Haut, Lunge, Niere, Hoden und des Gastrointestinaltrakts exprimiert. Sowohl das humane β -Defensin 1 (HBD-1) als auch das Mausortholog mBD-1 werden z.B. in den intestinalen Epithelzellen konstitutiv exprimiert und können nicht durch inflammatorische Stimuli induziert werden. Dagegen ist HBD-2 bzw. das Ortholog mBD-3 im Darm erst nach Infektion oder proinflammatorischen Stimuli nachweisbar (O'Neil et al., 1999).

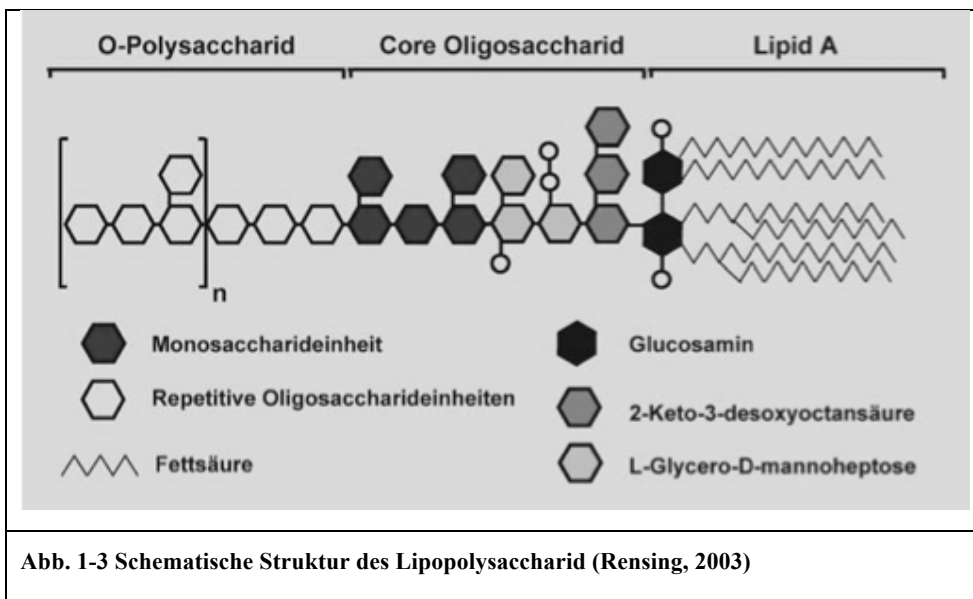
Bei CED können verstärkt α - und β -Defensine im Epithel des Gastrointestinaltraktes nachgewiesen werden. So wird z.B. das konstitutiv exprimierte α -Defensin Crp4 während einer DSS-induzierten Kolitis in der Maus hochreguliert (Rahman et al., 2010).

1.4.2 Bactericidal / Permeability - Increasing Protein (BPI)

Die Mitglieder der Bactericidal / Permeability - Increasing Protein (BPI) - Familie sind Proteine, die in der Lage sind, Lipopolysaccharide (LPS), ein Bestandteil der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien, effektiv zu binden und damit zu neutralisieren. Mitglieder dieser LPS-neutralisierenden Proteine sind unter anderem

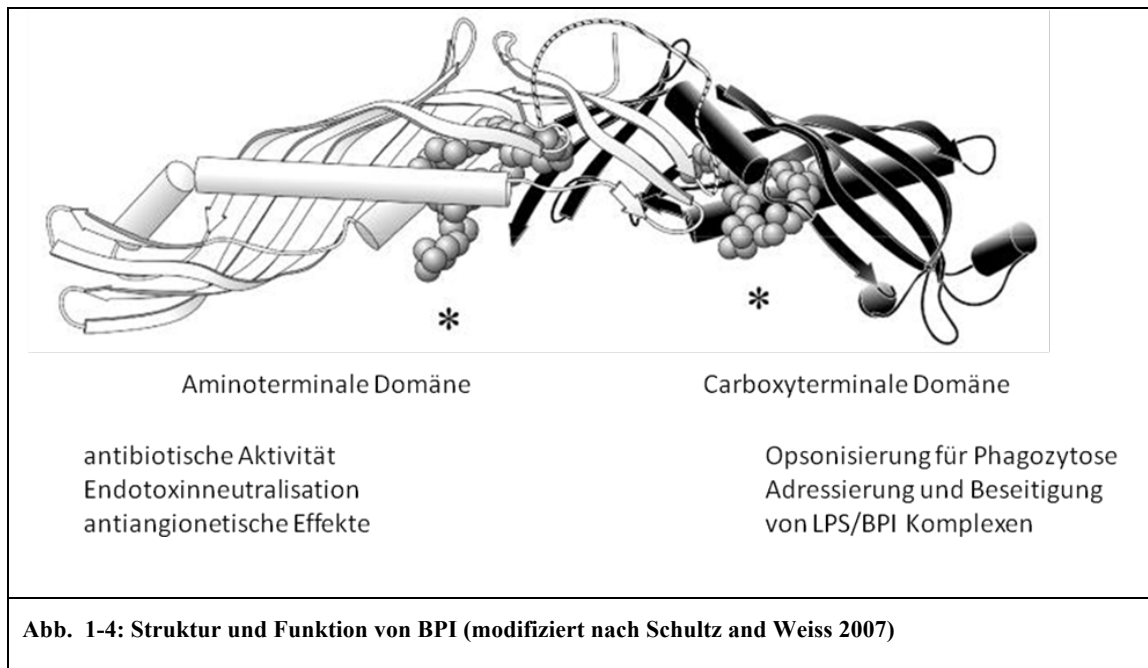
das LPS-bindende Protein (LBP) und BPI.

LPS besteht aus einem O-Antigen, einem Kernpolysaccharid und dem Lipid A (Raetz, 1990; Rietschel et al., 1994). Das außen liegende O-Antigen setzt sich aus wiederholenden Oligosacchariden zusammen. Diese O-spezifische Polysaccharidkette weist zwischen den Bakterienspezies Unterschiede auf und besitzt einen antigenen Charakter. Das Kernpolysaccharid besteht aus einem äußeren und inneren Kern. Das hydrophobe Lipid A ist mit dem inneren Kern des Polysaccharids über eine kovalente Bindung verbunden und verankert das Molekül in der bakteriellen Zellmembran.



LPS besitzt endotoxische Eigenschaften, welche über das Lipid A vermittelt werden. Wird LPS durch Zellteilung oder Lyse der Bakterien freigesetzt, werden u. a. Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren stimuliert (Westphal et al., 1981).

Das humane BPI (huBPI) konnte zuerst in den Granula von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Weiss et al., 1978). BPI ist ein ca. 55 kDa großes, kationisches Protein und weist eine symmetrische Anordnung von zwei BPI-Domänen auf. Die N-terminale Region ist für die antimikrobiellen Eigenschaften sowie für die LPS-Neutralisation verantwortlich. Die C-terminale Domäne dient der Opsonisierung von Bakterien. Dadurch können diese besser von den phagozytierenden Zellen des Immunsystems aufgenommen und eliminiert werden (Elsbach et al., 1998). Abbildung 1-4 zeigt die dreidimensionale Struktur von BPI mit den zugehörigen Funktionen.



In Mäusen, Hasen, Ratten und Invertebraten konnte ein Homolog des huBPI nachgewiesen werden. Das murine BPI (mBPI) wird hauptsächlich im Hoden, lymphatischen Geweben und Organen exprimiert, konnte aber auch im Darm nachgewiesen werden (Lennartson et al., 2005; Canny et al., 2002; Canny et al., 2006). Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen BPI und CED festgestellt. So synthetisieren Morbus Crohn Patienten in 30% der Fälle Autoantikörper gegen BPI und auch ein gehäuftes Auftreten von Polymorphismen in BPI konnte in dieser Patientengruppe nachgewiesen werden (Klein et al., 2005; Schinke et al., 2004).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Aktivierung und Freisetzung von murinem BPI durch enterale Bakterien und deren Bestandteile sowohl *in vitro* als auch *in vivo* analysiert werden. Dazu sollte zunächst die Regulation von murinem BPI *in vitro* und *in ex vivo* isolierten Darmepithelzellen untersucht werden.

Weiterhin sollte analysiert werden, ob BPI Schutz vor entzündlichen Darmerkrankungen im Darm vermittelt. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe des DSS-Kolitis Modells eine entzündliche Darmerkrankung in Wildtyp- und anschließend auch in BPI-defizienten Mäusen induziert und auf typische Kolitis-Merkmale untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, die Pathomechanismen, die einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zu Grunde liegen, besser zu verstehen.

2 Material

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6 (Jackson Laboratory) und *BPI - knock out-* ($BPI^{-/-}$) Mäuse (Prof. Dr. Gessner, Universität Regensburg) untersucht. Der genetische Hintergrund der Gen-defizienten Mäuse war C57BL/6. Die Haltung der Tiere erfolgte in einzeln belüfteten Käfigen unter keimarmen Bedingungen. Die Raumtemperatur (RT) lag bei 20 °C, die Luftfeuchtigkeit war konstant und ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h wurde eingehalten.

2.2 Zelllinien

Für die Durchführung von *in vitro* Experimenten wurde die murine intestinale Epithelzelllinie mIC_{C12} (Vanderwalle *et. al.*, 1996) untersucht. Die Kultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂.

Tabelle 2-1: Verwendete Zelllinie

Name	Ursprung	Referenz
mIC _{C12}	Murine Epithelzelllinie	Vanderwalle et al., 1996

2.3 Chemikalien und Reagenzien

100 bp DNA Leiter	Life Technologies (Darmstadt)
2-Mercaptoethanol	Life Technologies (Darmstadt)
Accutase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Agarose	Peqlab (Erlangen)
Ammoniumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bicin	Roth (Karlsruhe)
Bis-Tris	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
BSA	Merck (Darmstadt)
Collagenase D	Roche (Mannheim)
CFSE	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DEPC	Roth (Karlsruhe)
Desoxycholat	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 2,5 mM)	Thermo Scientific (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Dispase	BD Biosciences (Heidelberg)
DSS	MP Biomedicals (Heidelberg)
DMEM/Ham's F-12 (1:1)	Life Technologies (Darmstadt)
Dulbecco's PBS (1 x)	PAA (Pasching, Österreich)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth (Karlsruhe)
EGF	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Eosin G	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (99,8 % p.a.)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Fc-Block Ratte IgG	Dianova (Hamburg)
Flüssiger Stickstoff	Linde (Pullach)
Fötales Kälberserum (FKS)	Life Technologies (Darmstadt)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Glukose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
HBSS	Life Technologies (Darmstadt)
HEPES	PAA (Pasching, Österreich)
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Insulin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Methanol (100 % p.a.)	Roth (Karlsruhe)
MOPS	Roth (Karlsruhe)
Natriumazid	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat	Roth (Karlsruhe)

Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumpyruvat	Life Technologies (Darmstadt)
Natriumselenit	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Nichtessentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies (Darmstadt)
Percoll	GE Healthcare (München)
RPMI 1640 (25 mM HEPES und L-Glutamin)	GE Healthcare (München)
RNase (1 mg/mL)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Karlsruhe)
Pepstatin A	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Transferrin	Life Technologies (Darmstadt)
Triiodothyronin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Tris-HCl	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Tween® 20	Merck (Darmstadt)
Xylencyanol	Serva (Heidelberg)

2.4 Kits und Enzyme

Bradford Protein Reagent	Thermo Scientific (Karlsruhe)
CD19 MicroBeads	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
GoTaq DNA Polymerase	Promega (Mannheim)
Immobilon™ Western Chemiluminescent	
HRP Substrate	Millipore (Schwalbach/Ts.)
Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific (Karlsruhe)
Maxima™ Probe/ROX qPCR Master Mix	Thermo Scientific (Karlsruhe)
Murine IL-1β ELISA Development Kit	PeptoTech (Hamburg)
Murine MIP-2 ELISA Development Kit	PeptoTech (Hamburg)
RNA Mini Kit	Bio&Sell (Feucht)
QIAmp® DNA Stool Kit	Qiagen (Hilden)
DNase I	Thermo Scientific (Karlsruhe)

2.5 Antikörper

Tabelle 2-2: Primär- und Sekundärantikörper für Western Blot

Antigen	Klon	Verdünnung	Ursprungsspezies	Hersteller
HSP70	7/Hsp70	1:4000	Maus	BD Biosciences
β-Aktin	polyklonal	1:2500	Kaninchen	Sigma-Aldrich
Anti-Maus IgG	polyklonal	1:10000	Ziege	Dianova
Anti-Kaninchen IgG	polyklonal	1:10000	Esel	Dianova

Tabelle 2-3: Antikörper und Standard für mIL-6 ELISA

Antikörper	Verwendung	Konzentration	Hersteller
Anti-Maus IL-6	Beschichtung	0,5 mg/mL	R&D
Murines IL-6	Standard	10 µg/mL	R&D
Biotin-Ratte Anti Maus IL-6	Detektion	50 µg/mL	R&D
Avidin-HRP-Konjugat	Konjugat	unbekannt	Pepro Tech

Tabelle 2-4: Antikörper Fc Block

Fc Block	Konzentration	Hersteller
ChromPure SyrianHamster IgG	1,12 µg/mL	Jackson Immuno Research
ChromPure Rabbit IgG	0,22 µg/mL	Jackson Immuno Research
ChromPure Rat IgG	0,224 µg/mL	Jackson Immuno Research

Tabelle 2-4: Antikörper und Isotypenkontrolle für Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Konzentration	Ursprungsspezies	Hersteller	Markierung
CD3e	145-2C11	4 µg/mL	Hamster	BD Biosciences	PE
CD11b	M1/70	2 µg/mL	Ratte	BD Biosciences	APC
CD11c	N418	0,4 µg/mL	Hamster	eBioscience	APC
CD19	6D5	1:25	Ratte	Miltenyi	APC
CD45R/B220	RA3-6B2	4 µg/ml	Ratte	BD Biosciences	APC
CD49b/PanNK	DX5	0,4 µg/mL	Ratte	BD Biosciences	APC
F4/80	BM8	0,4 µg/mL	Ratte	eBioscience	PE
Hamster IgG1	G235-2356	0,4 µg/mL	Hamster	BD Biosciences	APC
Hamster IgG1κ	A19-3	4 µg/mL	Hamster	BD Biosciences	PE

Ly-6G	RB6-8C5	2 µg/mL	Ratte	eBioscience	FITC
MHCII	M5/114.15.2	0,2 µg/mL	Ratte	eBioscience	PE
m IgG2ak	G155-178	0,4 µg/mL	Maus	BD Biosciences	PE
NK-1.1	PK136	0,2 µg/mL	Ratte	BD Biosciences	PE
Rat IgG2a	eBR2a	8 µg/mL	Ratte	eBioscience	APC
Rat IgG 2bκ	A95-1	2 µg/mL	Ratte	BD Biosciences	FITC
Rat IgG 2bκ	A95-1	0,5 µg/mL	Ratte	BD Biosciences	PE
Rat IgMκ	R4-22	0,4 µg/mL	Ratte	BD Biosciences	APC

2.6 Oligonukleotide

Tabelle 2-5: Oligonukleotide

Gen	Primer	Sequenz 5'→3'	Orien- tierung	Modi- fikation
mActin	mActin1F	CACCCGCCACCAGTTCGCCA	<i>sense</i>	
	mActin2R	CAGGTCCCGGCCAGCCAGGT	<i>antisense</i>	
mBPI	mBPI TM1F	GGATCCGGTTCAGCCACTT	<i>sense</i>	
	mBPI TM2R	CCGCTTCAAGCAACAGGAA	<i>antisense</i>	
	mBPI-Probe	ACGTTTTACCCCTACCAGAA	<i>sense</i>	5' 6-Fam 3' BHQ-1
mCrp4	mCrp4 for	CCAAAACACAGATGAGGAGAC	<i>sense</i>	
	mCrp4 rev	CAGCCTCCTTTTCTACAATAGC	<i>antisense</i>	
	mCrp4-Probe	CCTTTGGAGACCCAGAAGGATCTGCT CTTCAT	<i>sense</i>	5' 6-Fam 3' BHQ-1
mIL17C	mIL17C for	TGCTGGAAGCTGACACTCAC	<i>sense</i>	
	mIL17C rev	CGACACAAGCATTCTGCCAC	<i>antisense</i>	
	mIL17C-Probe	CGACACAGATGAGAACCGCTACCC ACAGAA	<i>sense</i>	5' 6-Fam 3' BHQ-1

mPBGD	PBGD 3F	ATGTGCCTACCATACTACCTC	<i>sense</i>	
	PBGD 4R	GAAAGACAACAGCATCACAAG	<i>antisense</i>	
	PBGD Probe	GGAGCCATCTCGAAACGGGAAAA	<i>sense</i>	5' 6-Fam 3' BHQ-1

2.7 Stimulanzen

Tabelle 2-6: Stimulanzen

Stimulanz		Hersteller
LPS	Lipopolysachharid aus <i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PGN	Peptidoglycan	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<i>E. coli</i>		Institut für Immunologie (Marburg)

2.8 Puffer, Medium und Lösungen

2.8.1 Zellkultivierung

Kulturmedium RPMI komplett	500 mL RPMI 1640 10 % FKS 2 % Antibiotika (S/P) (100 U/mL - 100 µg/mL) 1 % L-Glutamin (2 mM) 0,5 % 2-Mercaptoethanol (0,25 mM)
Kulturmedium DMEM/Ham's F12 komplett	500 mL DMEM/Ham's F-12 11 mM Glukose 1,1 g/L Natrium- hydrogencarbonat 2 % FKS 1x nichtessentielle Aminosäuren 10 ng/mL EGF

50 nM Dexamethason
5 µg/mL Insulin
30 nM Natriumselenit
5 µg/mL Transferrin
1 nM Triiodothyronin
1 % Antibiotika (S/P)
(100 U/mL - 100 µg/mL)

2.8.2 Isolation Primärzellen

CD-Puffer
1x HBSS (Ca²⁺ und Mg²⁺ frei)
5 mM EDTA
10 mM HEPES

Digestion Mix
1x HBSS (Ca²⁺ und Mg²⁺ frei)
500 µg/mL Collagenase D
200 µg/mL DNaseI
50 U/mL Dispase
4 % FKS

2.8.3 MACS-Aufreinigung

MACS-Puffer
1x PBS
0,5 % BSA
2 mM EDTA

2.8.4 Agarosegel-Elektrophorese

50x TAE
40 mM Tris
0,1 % Essigsäure
1mM EDTA

2.8.5 Proteinisolation

RIPA-Lysepuffer
50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1 % Igepal CA-630

0,25 % Desoxycholat
1 ng/mL Aprotinin
(frisch hinzufügen)
1 ng/mL Leupeptin
(frisch hinzufügen)
1 ng/mL Pepstatin A
(frisch hinzufügen)

2.8.6 Western Blot

SDS-Probenpuffer (6x Laemmli)

12 % SDS
12,5 % 2-Mercaptoethanol
(6,25 mM)
50 % Glycerol
0,012 % Bromphenolblau
0,375 % Tris-HCl
0,2 M Tris
5 M NaCl (pH 7,5)

20x MOPS/SDS Laufpuffer

1 M MOPS
1 M Tris
69,3 M SDS
20,5 M EDTA

1x MOPS/SDS Laufpuffer

50 mL 20x MOPS/SDS
Laufpuffer
950 mL Aqua bidest.

20x Transferpuffer

500 mM Bicin
500 mM Bis-Tris
20,5 mM EDTA

1x Transferpuffer

50 mL 20x Transferpuffer
950 mL Aqua bidest.

10x TBS	5 M NaCl 35 mM Tris 165 mM Tris-HCl
1x TBS	100 mL 10x TBS 900 mL Aqua bidest.
1x TBST	1 mL Tween [®] 20 100 mL 10x TBS 900 mL Aqua bidest.
Blockierungsreagenz	1x TBST 5 % Magermilchpulver
Antikörperlösung	1x TBST 1 % Magermilchpulver

2.8.7 ELISA

Waschpuffer	1x PBS 0,05 % Tween [®] 20
Blockpuffer	1x PBS 1 % BSA
Verdünnungspuffer	1x PBS 0,1 % BSA 0,05 % Tween [®] 20

2.8.8 Durchflusszytometrie

FACS-Puffer	1x PBS 3 % FKS 0,01 % NaN ₃
-------------	--

2.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage R160P-D1	Sartorius GmbH (Göttingen)
Bechergläser	Merck (Darmstadt)
Dispergierer MICCRA D-9	ART Prozess- & Labortechnik GmbH (Müllheim)
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson (Basel)
Einweg-Handschuhe	VWR (Darmstadt)
FLUOstar Omega	BMG Labtech (Ortenberg)
Gel Doc™ EZ System	BioRad (München)
Heizblock TS-100	Peqlab (Erlangen)
IKA-Schüttler MTS2	IKA-Werke (Staufen)
Impföse	VWR (Darmstadt)
Inkubator HeraCell 240i	Heraeus (Hanau)
Leica DMIL (inverses Mikroskop)	Zeiss-Optik (Jena)
Magnetrührer	Heidolph (Schwabach)
Messzylinder	Merck (Darmstadt)
Multiwellplatten	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Xcell II Mini Cell (Blot Modul)	Novex (San Diego, USA)
pH-Meter pH523	WTW (Weilheim)
Plattenphotometer Emax microplate reader	Molecular Devices (Ismaning)
Pipetboy	IBS Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten	PeqLab (Erlangen)
Neubauer Zählkammer	W. Schreck (Hofheim)
NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel	Life Technologies (Darmstadt)
Präparierbesteck	Fine Science Tools (Heidelberg)
PVDF Immobilon-P Transfermembran	Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.)
Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
Rotorgene™ 6000 (<i>real-time-cycler</i>)	Qiagen (Hilden)
Schwenktisch (Duomax 1030)	Heidolph (Schwabach)
SDS-PAGE-Kammer Perfect Blue Twin S	PeqLab (Erlangen)

Spektrophotometer NanoDrop-1000	Thermo Scientific (Schwerte)
Sterilbank Hera Safe KS	Thermo Scientific (Schwerte)
Stericup [®] Filter Units	Millipore (Schwalbach/Ts.)
Thermocycler C1000 thermal cycler	BioRad (München)
Vortex-Schüttler VF2	IKA-Labortechnik (Staufen)
Whatman-Papier GB003 S	Schleicher+Schuel (Dassel)
Zellkultur Einweg-Plastikartikel (Gewebekulturflaschen, Pipettenspitzen, Pipetten, Zentrifugationsröhrchen, kleine Petrischalen)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge MIKRO 200R	Hettich (Tuttlingen)
Zirconia/Silica beads 0,5 mm	BioSpec Products (Bartlesville, USA)

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultivierung

Die murine intestinale Epithelzelllinie mIC_{c12} wurde in DMEM/Ham's F-12 Komplett Kulturmedium kultiviert. Die Inkubation der Zelllinie als adhärenzte Monolayer-Kultur erfolgte in sterilen Kulturflaschen verschiedener Größen bei 37°C, 5 % CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit.

Für das Passagieren wurde das Medium abgenommen und die konfluenten Zellen mit 5 mL PBS gewaschen. Nach Zugabe von Accutase wurden die Zellen für 15 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion mit 5 mL DMEM/Ham's F-12 Komplett abgestoppt und die Zellen nach dem Resuspendieren für 5 min bei 400 g, 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in entsprechender Menge Kulturmedium resuspendiert und in neue sterile Kulturflaschen überführt.

3.1.2 Isolation von murinen Krypten, Epithelzellen und Lamina Propria Lymphozyten

Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet, der Dünndarm entnommen und von mesenterialen Fett und den Payer'schen Platten befreit. Um Stuhlreste zu entfernen, wurde der Dünndarm longitudinal aufgetrennt und gründlich mit PBS gespült.

Um Epithelzellen und Krypten zu isolieren, wurde der Dünndarm in 5 mL Zell-Dissoziationspuffer (CD-Puffer) für 10 min bei 37 °C, 100 rpm und im 45° Winkel in einem Falcon-Röhrchen inkubiert. Nach dem Vortexen wurde der Überstand in ein Falcon-Röhrchen überführt und der Darm anschließend noch zweimal in CD-Puffer inkubiert. Das Falcon-Röhrchen mit dem Überstand wurde mit kaltem PBS aufgefüllt, invertiert und für 10 min bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand, welcher die Epithelzellen enthielt, wurde aufgefangen. Das Zellpellet wurde in 50 mL kaltem PBS vorsichtig resuspendiert und erneut für 10 min und 4 °C sedimentiert. Um die Reinheit der Krypten zu erhöhen, wurde die Sedimentation zwei Mal wiederholt. Anschließend erfolgte die mikroskopische Zellzahlbestimmung der Epithelzellen und Krypten.

Um Lamina Propria Lymphozyten aus dem Dünndarm zu isolieren, wurde dieser in

10 mL CD-Puffer für 20 min bei 37 °C, 100 rpm und im 90 ° Winkel inkubiert, gevortext und der Überstand verworfen. Die Inkubation in CD-Puffer wurde erneut wiederholt. Mithilfe eines Skalpells wurde der Dünndarm zerkleinert, in 5 mL Digestionspuffer aufgenommen und für 20 min, 37 °C, 100 rpm und im 90 ° Winkel inkubiert. Nach Vortexen wurde der Überstand mittels einem Zellsieb mit 70 µm Porengröße gefiltert. Anschließend erfolgte die dreimalige Wiederholung der Verdauung des Gewebes in Digestionspuffer. Der filtrierte Überstand wurde mittels Zentrifugation bei 2000 rpm, 4 °C und 10 min pelletiert. Danach wurde das Zellpellet in 40 %igem Percoll resuspendiert und auf 80 %igem Percoll geschichtet. Es folgte eine Dichtegradientenzentrifugation bei 2500 rpm, Raumtemperatur (RT), ohne Bremse für 20 min. Die Interphase wurde abgenommen und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer und nach Eosin-Ausschlußfärbung bestimmt.

3.1.3 MACS-Aufreinigung von B-Zellen

Mit Hilfe der MACS (*magnetic cell separation*) Aufreinigung lassen sich bestimmte Zellpopulationen mittels spezifischer Antikörper gegen Oberflächenmarker isolieren. Diese Antikörper sind mit Eisenoxid-Dextran-Partikeln gekoppelt und können so über ein starkes Magnetfeld getrennt werden. Um B-Zellen aus der Milz zu analysieren, wurden CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec) verwendet.

Die Milz wurde den Mäusen entnommen und mit Hilfe eines Spritzenstempels in einem 70 µm Zellsieb zerkleinert. Die Zellen wurden in RPMI-Komplett vereinzelt und für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 mL Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach 7 minütiger Inkubation wurde die Lyse durch Zugabe von 10 mL RPMI-Komplett gestoppt und die Zellen 5 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in RPMI-Komplett resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Anschließend erfolgte die MACS-Aufreinigung laut Herstellerprotokoll. Hierfür wurde eine LS-Säule verwendet, die in einem Magneten platziert wurde. Die CD19-markierten B-Zellen wurden dabei an die Säule gebunden und konnten im Anschluß durch Spülen mit MACS-Puffer ausserhalb des Magnetfeldes geerntet werden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min, 300 x g und 4 °C. Nach Resuspension der Zellen in RPMI-Komplett wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden vor weiteren Experimenten im FACS (siehe

3.5) analysiert.

3.1.4 B-Zell Proliferationsassay

Der Einfluss verschiedener Stimulanzen auf die Proliferation lässt sich mittels CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidylester)-Färbung untersuchen. Dabei werden die Zellen mit CFSE markiert. Dieser Farbstoff wird mit jeder Zellteilung äquimolar an die beiden entstehenden Tochterzellen aufgeteilt. Die fluoreszierende Eigenschaft der Substanz kann mittels Durchflusszytometrie gemessen werden, wobei die Fluoreszenz proportional mit jeder Teilung abnimmt, so dass durch die Farbintensität indirekt auf die Zellteilungen geschlossen werden kann.

1×10^7 B-Zellen wurden in 10 mL PBS aufgenommen und für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift ein Mal wiederholt. Das Zellpellet wurde mit 5 µM CFSE-Lösung resuspendiert und für 10 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit 8 mL RPMI-Komplett gewaschen. Je Well wurden 1×10^5 Zellen in einer 96-Well Platte ausplattiert und stimuliert. Nach 72 h wurden die Zellen eingesammelt und mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.5) analysiert.

3.2 Die Dextransulfat (DSS) induzierte Kolitis

Um eine akute Kolitis zu induzieren, wurde 1,75 % Dextransulfat (DSS) in Leitungswasser gelöst und mittels eines Stericup® sterilfiltriert. Die DSS-Lösung wurde den Tieren für fünf Tage oral verabreicht. Es erfolgte die tägliche Gewichtskontrolle bis einschließlich Tag 12.

3.2.1 Probengewinnung

Das Colon wurde aus den Mäusen präpariert und die Länge mittels Lineal bestimmt. Zur Analyse der Zytokinfreisetzung wurde lateral 1 cm vom Colon abgetrennt, longitudinal aufgeschnitten und mithilfe von kaltem PBS von Stuhlresten befreit. Anschließend erfolgte die Gewichtsbestimmung. Die Gewebestücke wurden in RPMI Komplett bei 37 °C, 5% CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Zytokinbestimmung bei -20 °C gelagert. Für Proteinanalysen wurde 0,5 cm Colon abgeschnitten und in RIPA-Lysepuffer aufgenommen (siehe 3.4.1). Zur RNA-Analyse wurden 0,5 cm Colon in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Isolation bei -80 °C gelagert (siehe 3.3.1.). Für histologische Analysen wurden 1 cm distal vom Colon in 4 %iger

Formaldehydlösung fixiert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert. Die histologischen Untersuchungen erfolgten im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt von Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Fend.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolation aus Zellkulturen, Primärzellen und Gewebe

Für die RNA-Isolation aus mIC_{c12}- und Primärzellen wurden diese bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde bis zur Präparation bei -80°C gelagert. Um RNA aus dem Dünndarm bzw. Colon zu isolieren, wurden diese in 400 µL Lysepuffer aufgenommen und mittels Dispergierer (MICCRA D-9, ART Prozess- & Labortechnik GmbH) zerkleinert.

Die RNA wurde mit Hilfe des RNA Mini Kit (Bio&Sell) laut Herstellerangaben isoliert.

3.3.2 RNA-Quantifizierung

Um die Konzentration der RNA zu bestimmen, erfolgte die photometrische Messung von 1 µL Probenlösung bei einer Wellenlänge von 260 nm am NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

Der Quotient $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ bestimmt die Reinheit der RNA und liegt idealerweise bei 2.

3.3.3 cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase

Um den mRNA-Gehalt von spezifischen Genen zu quantifizieren, wurde 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurde mittels DNase-Verdau eventuell vorhandene Kontamination mit genomischer DNA entfernt (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: 1x DNase Verdau

1x DNase Verdau	9 µL
RNA (1 µg)	x µL
10x Reaction Buffer	1 µL
DNase I (1 U/µl)	1 µL
Nuklease freies H ₂ O	y µL

Der DNase Verdau wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µL DNase Stopp-Lösung (EDTA, 50 mM) und 10 minütiger Inkubation bei 65 °C gestoppt. Durch Zugabe von 10 µL des Mastermixes wurde der Ansatz komplementiert (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Mastermix für cDNA-Synthese

1x Mastermix	10 µL
5x Reaction Mix	4 µL
Maxima Enzyme Mix	2 µL
Nuklease freies H ₂ O	4 µL

Die cDNA-Synthese erfolgte in einem Thermocycler (C1000 thermal cycler, BioRad). Das verwendete Programm ist in Tabelle 3-3 aufgeführt.

Tabelle 3-3: Thermocycler-Programm zur cDNA-Synthese

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Annealing	25°C	10 min
cDNA-Synthese	50°C	15 min
Denaturierung	85°C	5 min

Die Qualität der cDNA wurde mittels Aktin-PCR kontrolliert (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: 1x PCR-Ansatz für Qualitätskontrolle cDNA

1x PCR-Ansatz	25 µL
5x Green GoTaq Puffer	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µL
dNTPs (10 mM)	0,5 µL
Aktin-1F (40 µM)	0,125 µL
Aktin-2R (40 µM)	0,125 µL
GoTaq DNA Polymerase (5 U/µL)	0,25 µL
Nuklease freies H ₂ O	15,5 µL
cDNA	1 µL

Für die PCR-Reaktion wurde folgendes Programm verwendet:

Tabelle 3-5: PCR-Programm für Qualitätskontrolle cDNA

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	30 s
3. Annealing	60°C	30 s
4. Elongation	72°C	30 s
Wiederholung Schritt 2-4: 35x		
6. Letzter Elongationsschritt	72°C	10 min
7. Kühlung	4°C	5 min

3.3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit, DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und diese mit Hilfe eines Längenstandards zu bestimmen. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1 %igem Agarose Gel. Dazu wurde 1 g Agarose in 100 mL 1x TAE durch Aufkochen gelöst. Jeweils 10 µL der Proben (der Ladepuffer ist bereits im Taq-Puffer enthalten) und 6 µL Längenstandard Gene Ruler™ 100 bp wurden aufgetragen und bei einer Stromstärke von 120 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für ca. 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt und mit Hilfe des Gel Imager (Fröbel Labor Technik) dokumentiert.

3.3.4 Sonden-basierte quantitative Echt-Zeit-PCR (qRT-PCR)

Die Sonden-basierte qRT-PCR bietet neben der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die Möglichkeit der Quantifizierung mittels Fluoreszenz, wobei die Fluoreszenzintensität mit der Menge der PCR-Produkte proportional zunimmt.

Neben den spezifischen Primern wird zusätzlich eine sequenzspezifische Oligonukleotid-Sonde verwendet, die zwischen den spezifischen Primern in der zu amplifizierenden Sequenz bindet und am 5'-Ende mit einem fluorigenen Reporterfarbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert ist. Das Fluoreszenzsignal wird durch die räumliche Nähe beider Farbstoffe inhibiert. Durch die 5'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase wird das Fluorophor während der Vervielfältigung der Zielsequenz abgespalten und das Fluoreszenzsignal in jedem Zyklus am Ende des Elongationsschrittes gemessen.

Durch Messung eines internen Standards für jedes zu analysierende Gen kann die Kopienzahl des amplifizierten Gens bestimmt werden. Um die Schwankungen der cDNA-Präparationen in jeder Probe zu kontrollieren, wird neben dem Zielgen in einer weiteren PCR ebenfalls ein Referenzgen wie z.B. PBGD analysiert. Dieses Referenzgen ist typischerweise ein *house-keeping* Gen, welches unter den Stimulationsbedingungen in seiner Expression unverändert bleibt. Durch die Bildung des Quotienten aus der bestimmten Kopienzahl des Zielgens und des Referenzgens kann eine absolute Quantifizierung vorgenommen werden und damit auch Proben miteinander verglichen werden, die aus unterschiedlichen Experimenten stammen.

Tabelle 3-6 zeigt einen Ansatz der qRT-PCR mittels Maxima™ Probe/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific).

Tabelle 3-6: 1x qRT-PCR Ansatz

1x Ansatz	15 µL
Maxima™ Probe/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific)	7,5 µL
Primer fw (40 µM)	0,1125 µL
Primer rev (40 µM)	0,1125 µL
Probe (40 µM)	0,075 µL
H ₂ O	6,2 µL
cDNA	1 µL

Für die Reaktion wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Tabelle 3-7: PCR-Programm für qRT-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95°C	15 min
2. Denaturierung	95°C	30 s
3. Annealing	62°C	30 s
4. Elongation	72°C	30 s
Wiederholung Schritt 2-4: 39x		

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Quantifizierung des Proteingehalts

3.4.1.1 Proteinisolation mittels RIPA

Für die Proteinisolation wurden die Colonstücke in 300 µL RIPA Lysepuffer aufgenommen und mithilfe eines Dispergierers (MICCRA D-9, ART Prozess- & Labortechnik GmbH) homogenisiert. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C erfolgte die Zentrifugation des Lysats für 30 min bei 15.000 rpm und 4°C. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt wurde mittels Bradford-Test quantifiziert. Dieser Test beruht auf der Färbung von Proteinen mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250. Im sauren Milieu kommt es zur Komplexbildung des Farbstoffes mit basischen Aminosäuren und dadurch zur Verschiebung des Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm (Bradford et al., 1976).

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurden 250 µL des Bradford-Reagenz mit 5 µL Proteinlysate gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT erfolgte die photometrische Bestimmung bei 595 nm. Mit Hilfe der gemessenen Extinktion und einer ermittelten Eichkurve wurden die Proteinkonzentrationen berechnet.

3.4.1.3 Western Blot-Analyse

3.4.1.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufzutrennen, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe von 4-12 %igen Bis-Tris Gradientengelen. Dazu wurden maximal 30 µg Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden nach dem Pipettierschema in Tabelle 3-8 vorbereitet und für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Zur Größenabschätzung der Proteine diente ein Proteinstandard. Die Elektrophorese erfolgte in einer Laufkammer mit 1x MOPS-Laufpuffer bei 120 V.

Tabelle 3-8: Zusammensetzung der Proteinproben

1x Ansatz	24 µL
Proteinlysats	x µL
6x Lämmli-Probenpuffer	4 µL
H ₂ O	y µL

3.4.1.3.2 Transfer

Im Tank-Blot-Verfahren wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert. Der Transfer erfolgte mittels 1x Transferpuffer bei 35 V für 2 h.

3.4.1.3.3 Immundetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese bei RT getrocknet und zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 5 %igem Magermilchpulver/TBST für 1 h bei RT blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C mit einem spezifischen primären Antikörper in geeigneter Verdünnung (Tabelle 2-2). Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran für 1 h mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Anschließend folgten drei Waschstschritte mit TBST. Zur Entfernung von Tween®-Rückständen auf der Membran wurde diese abschließend einmal mit TBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrat. Das darin enthaltene Substrat der Peroxidase setzt unter Lichtemission Luminol um, welches mittels dem Gel Doc™ EZ System (BioRad) dokumentiert und dem Programm „Image Lab™“ quantifiziert wurde.

3.4.1.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA bietet die Möglichkeit, Antigene mit Hilfe spezifischer Antikörper nachzuweisen. MIP-2 und IL-1β wurden mit Hilfe von spezifischen ELISA Kits (PeproTech) nach Herstellerangaben analysiert.

Für den IL-6 ELISA (Tabelle 2-3) wurden zunächst jeweils 50 µL pro well des spezifischen Beschichtungsantikörpers anti-Maus IL-6 (1 µg/mL in PBS) an eine 96-well Flachbodenplatte über Nacht bei 4°C gebunden. Um unspezifische Antikörperbindungen zu inhibieren, wurden 250 µL Blockpuffer pro well zugegeben

und für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 300 µL Waschpuffer pro well wurden jeweils 50 µL Probe in die wells pipettiert. Zur quantitativen Bestimmung des Zytokins wurde eine Standardreihe aus murinem IL-6 in 1:2 Verdünungen von 10 ng/mL bis 0,039 ng/mL mitgeführt. Nach 90-minütiger Inkubation wurde die Platte erneut gewaschen, um ungebundenes Probenmaterial zu entfernen. Zur Detektion des mIL-6 wurden jeweils 50 µL des 500 mg/mL Biotin-Ratte Anti-Maus IL-6 Antikörpers in die wells pipettiert und für 90 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem Avidin-HRP Konjugat (Verdünnung 1:2000). Anschließend wurde die Platte erneut vier Mal mit jeweils 300 µL Waschpuffer gewaschen und 50 µL TMB Super Sensitiv Substrat zugegeben. Durch die Bindung des Substrats an den HRP-Komplex kommt es zu einem Farbumschlag. Dieser ist proportional zur Menge des gebunden Antigens. Die Reaktion wurde mit 25 µL 1M Phosphorsäure gestoppt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm und wurde mit dem Programm „Softmax Pro“ ausgewertet.

3.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie, auch FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analyse genannt, lassen sich Zellpopulationen neben ihrer Größe und Granularität auch nach ihrem Immunphänotyp untersuchen.

Für die FACS-Analyse wurden $3,5 \times 10^5$ Zellen in FACS-Röhrchen pipettiert, mit 2 mL FACS-Puffer gewaschen und für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 30 µL Fc-Block resuspendiert und für 7 min bei 4 °C inkubiert, um die Fc-Rezeptoren zu blocken und damit unspezifische Antikörperbindungen zu inhibieren. Anschließend wurden die Fluorochrom-markierten Antikörper (Tabelle 2-4) in den entsprechenden Verdünnungen zu den Zellen gegeben und für 20 min bei 4 °C im Dunkeln gefärbt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1 mL FACS-Puffer gewaschen und das Zellpellet in 250 µL FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe des FACS-Calibur analysiert und die generierten Daten mit der Software „Flow Jo“ ausgewertet.

3.6 Mikrobiomanalyse

Mit der Mikrobiomanalyse lassen sich die vorkommenden Bakterienspezies im Darm untersuchen. Dazu wird die bakterielle DNA aus dem Stuhl von Mäusen isoliert und diese dann mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Messung erfolgte am Institut

für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Freiburg durch Dr. Vera Schwierzeck.

3.6.1 Probengewinnung

Der gesamte Darmtrakt der Mäuse wurde präpariert und longitudinal aufgetrennt. Mittels steriler Impföse wurde der Stuhl entnommen und in sterile Reaktionsgefäße überführt. Die bakterielle DNA wurde mit Hilfe des QIAmp[®] DNA Stool Kit (Qiagen) laut Herstellerangaben isoliert.

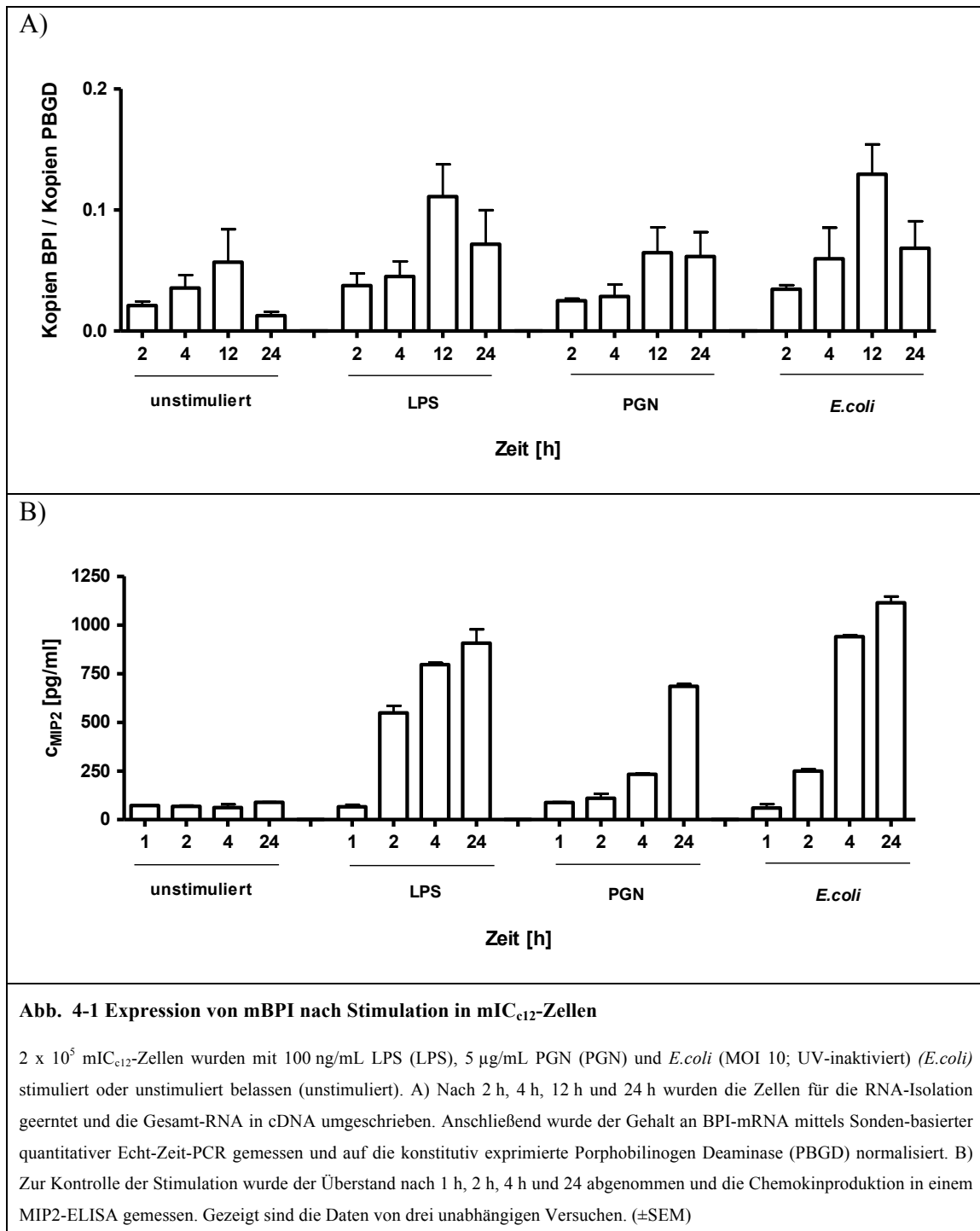
4 Ergebnisse

4.1 Expression und Regulation von murinem BPI in Darmepithelzellen

Antimikrobielle Peptide spielen eine wichtige Rolle bei der Homöostase und Regulation der Immunantwort des Verdauungstraktes. Eine Vielzahl dieser antimikrobiellen Peptide werden von den Darmepithelzellen und den Zellen der Lieberkühn'schen Krypten exprimiert (Ayabe et al., 2004; Abreu, 2010). Deshalb sollte zunächst untersucht werden, ob murines BPI in Darmepithelzellen nachgewiesen werden kann und ob die Expression durch Interaktion mit Bakterien bzw. bakteriellen Zellwandbestandteilen beeinflusst wird.

Zu Beginn wurden *in vitro* Analysen mit Hilfe der murinen embryonalen Darmepithelzelllinie mIC_{c12} durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen TLR-Liganden stimuliert. LPS ist ein Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien und induziert die Immunantwort über TLR4, Peptidoglykan (PGN), ein Hauptbestandteil der Zellwand Gram-positiver Bakterien, aktiviert dahingegen TLR2. Das Gram-negative Bakterium *E. coli* kommt im menschlichen als auch tierischen Darm vor und ist zudem in der Lage, Infektionskrankheiten zu induzieren.

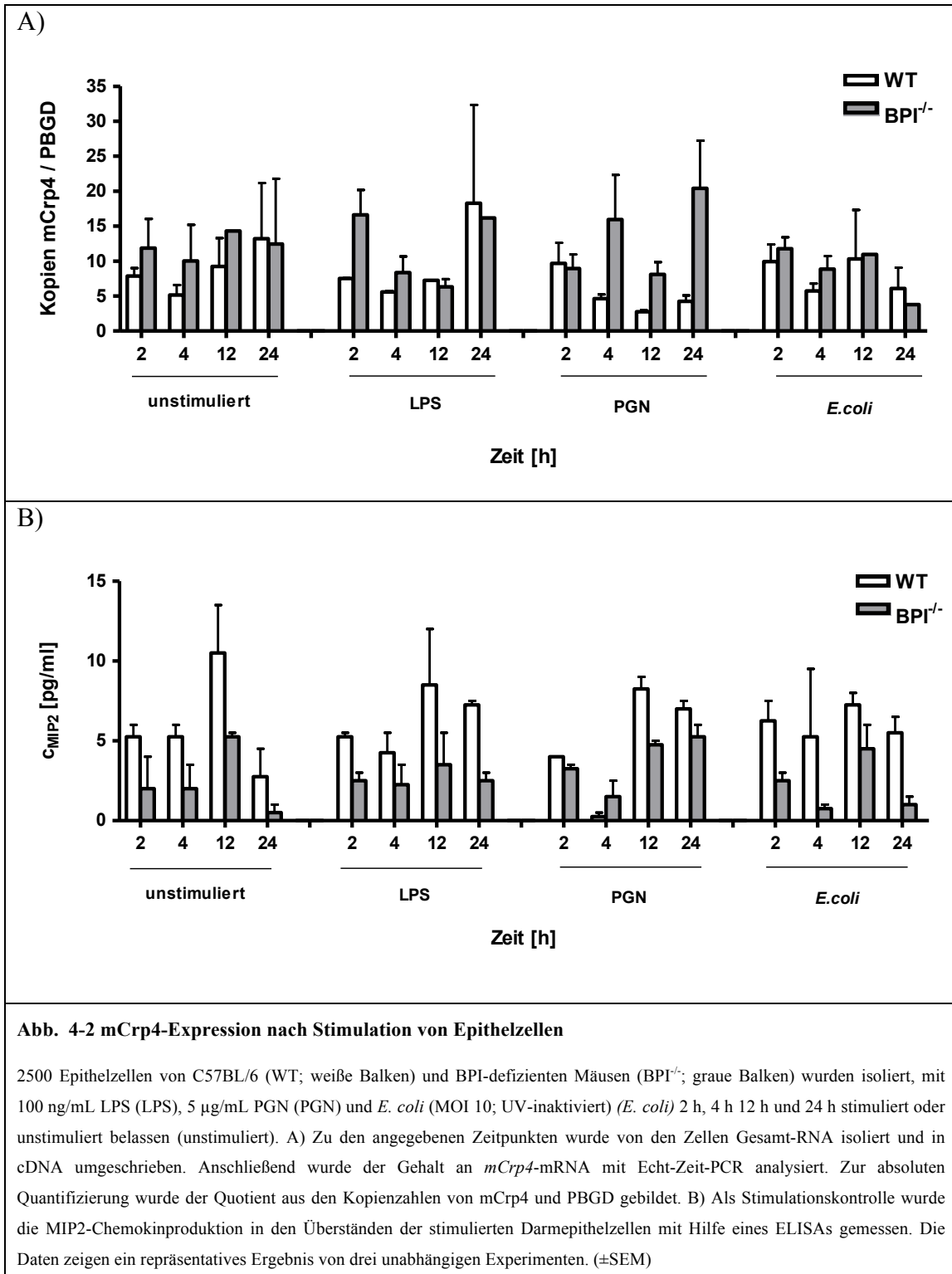
Die Analyse der mRNA-Expression von murinem BPI zeigt, dass die embryonale Darmepithelzelllinie mBPI zeitabhängig exprimiert. Durch Stimulation mit dem Zellwandbestandteil LPS als auch mit *E. coli* kann die mRNA-Synthese von mBPI nach 12 h bis auf das Doppelte verstärkt werden. Nach 24 h ist eine dreifach erhöhte mBPI-Expression im Vergleich zur Kontrolle durch alle drei TLR-Stimuli nachweisbar (Abb. 4-1 A).



mIC₁₂-Zellen weisen eine hohe Responsivität gegenüber allen drei TLR-Stimuli auf, was unter anderem durch die Sekretion von MIP2 nachgewiesen werden kann. Die MIP2-Konzentration steigt für alle verwendeten Stimuli in Abhängigkeit zur Stimulationszeit an (Abb. 4-1 B).

Nachdem *in vitro* gezeigt werden konnte, dass BPI in der Darmepithelzelllinie mIC₁₂ exprimiert und reguliert wird, sollte der Nachweis auch in *ex vivo* isolierten Darmepithelzellen erfolgen. Dazu wurden die Epithelzellen von WT und BPI-

defizienten Mäusen auf die Expression von mBPI untersucht. Die Analyse der mRNA-Synthese zeigt nur eine geringe Expression von murinem BPI, die zudem nicht durch die verwendeten TLR-Stimuli induzierbar ist (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle wurde die Expression von Cryptdin 4 (mCrp4), einem α -Defensin, analysiert. Abbildung 4-2 A zeigt, dass mCrp4 in WT- als auch in BPI^{-/-}-Mäusen nachweisbar ist. Jedoch ist auch hier die mRNA-Synthese nicht durch die verschiedenen TLR-Liganden induzierbar (Abb. 4-2 A). *Ex vivo* isolierte Darmepithelzellen sekretieren schon im unstimulierten Zustand MIP2 (Abb. 4-2 B). Die Zellen von WT-Mäusen weisen im Vergleich zu den BPI-defizienten Tieren eine höhere MIP2-Produktion auf. Die Stimulation mit den TLR-Liganden hat keinen weiteren Einfluss auf die Chemokinausschüttung (Abb. 4-2 B).



Die Untersuchungen zeigen, dass mBPI in Darmepithelzellen sowohl *in vitro* als auch *in ex vivo* isolierten Zellen nachweisbar ist. Jedoch wird die Transkription des antimikrobiellen Proteins in *ex vivo* isolierten Darmepithelzellen nicht durch bakterielle Zellwandbestandteile oder *E. coli* reguliert.

4.2 Verstärkte BPI-Expression während DSS-induzierter Kolitis

Durch die Analyse der mRNA-Expression von mBPI in Darmepithelzellen, stellte sich die Frage, ob mBPI eine Funktion bei der Regulation von Entzündungsprozessen und der Homöostase während einer Darmerkrankung einnimmt. Als Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) wurde das DSS-induzierte Kolitis-Modell gewählt. Dazu wurde WT-Mäusen 1,75 % DSS im Trinkwasser gegeben und zu verschiedenen Zeitpunkten die mBPI mRNA-Expression im Darm analysiert (Abb. 4-3). Es zeigt sich, dass die mRNA-Synthese von murinem BPI durch Gabe von DSS induziert wird. Die Expression steigt von Tag null bis Tag acht auf das Siebenfache an und reduziert sich mit Nachlassen der Kolitis am Tag 12 auf das Dreifache.

Die Ergebnisse zeigen, dass BPI während einer DSS-induzierten Kolitis verstärkt exprimiert wird.

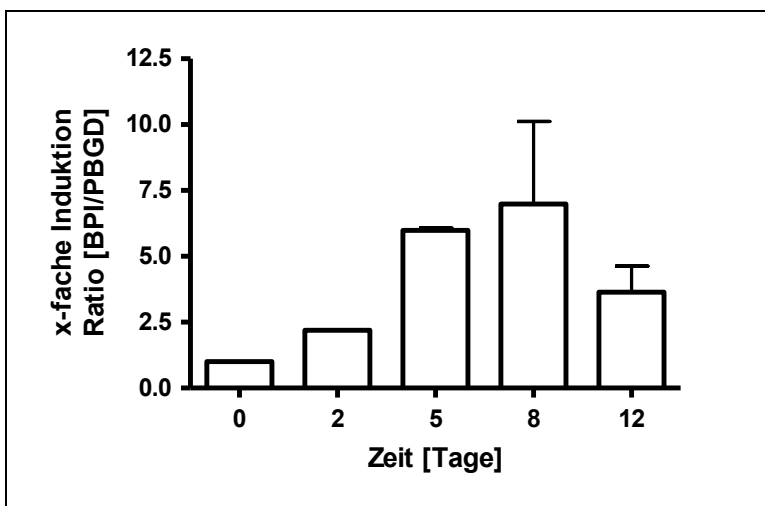


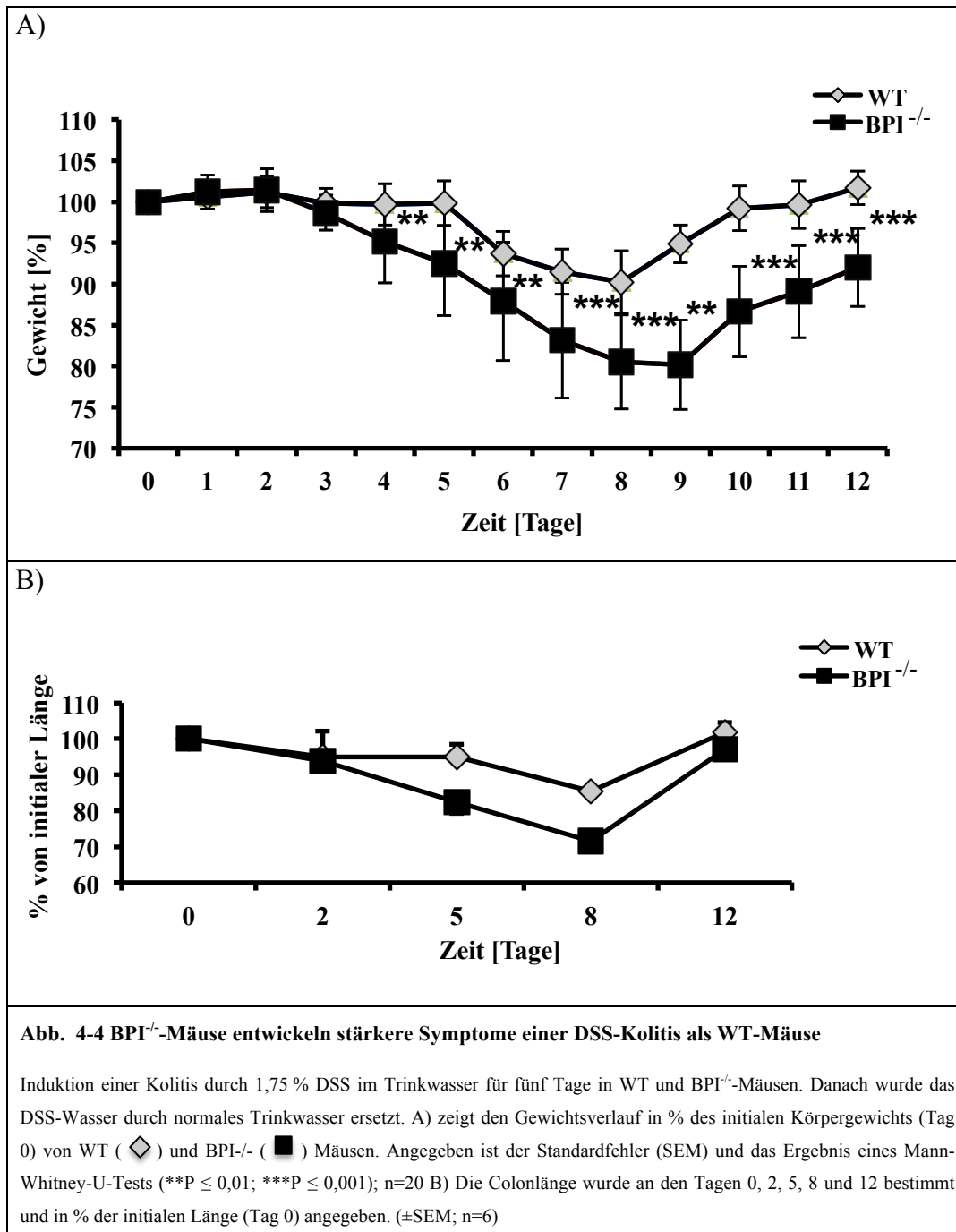
Abb. 4-3 Erhöhte mBPI-Expression im Colon während einer DSS-Kolitis in WT-Mäusen

Die Kolitis wurde durch Gabe von 1,75 % DSS im Trinkwasser für fünf Tage in C57BL/6-Mäusen induziert. Danach wurde das DSS aus dem Trinkwasser entfernt. Am Tag vor DSS-Gabe (0), sowie an Tag 2, 5, 8 und 12 wurde jeweils aus dem Colon der Mäuse die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die mBPI-Expression wurde mittels Echt-Zeit-PCR analysiert und zur Quantifizierung auf das Referenz-Gen PBGD normalisiert. Die Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. (\pm SEM)

4.3 BPI-defiziente Mäuse entwickeln eine starke DSS-induzierte Kolitis

Die vorangegangenen Analysen zeigten eine Induktion der mBPI mRNA-Expression während einer DSS-induzierten Kolitis. Um die Rolle von mBPI bei CED näher zu untersuchen, wurden neben WT-Mäusen auch BPI-defiziente Mäuse analysiert. Dazu

wurde eine akute Kolitis durch Gabe von DSS in beiden Genotypen induziert und die Mäuse auf typische Kolitis-Merkmale hin untersucht. In Abbildung 4-4 A ist der Gewichtsverlauf während einer DSS-induzierten Kolitis dargestellt. WT-Mäuse zeigen die stärkste Gewichtsreduktion am Tag acht von bis zu 10 %. Nach Tag acht erholen sich die Mäuse wieder von der akuten DSS-induzierten Kolitis und erreichen das Ausgangsgewicht an Tag 12. Dagegen nehmen BPI^{-/-} Mäuse bis zu 20 % ihres Körpergewichtes ab und die Erholungsphase dauert deutlich länger als bei WT-Mäusen (Abb. 4-4 A). Auch die Untersuchungen der Colonlänge zu verschiedenen Zeitpunkten zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Genotypen, wobei diese mit dem Gewichtsverlauf korrelieren (Abb. 4-4 B). Das Colon der BPI^{-/-}-Mäuse verkürzt sich an Tag acht um bis zu 30 %, während WT-Mäuse nur eine 15 %ige Reduktion der Colonlänge aufweisen.



Um den schwerwiegenderen Verlauf der DSS-Kolitis in den BPI^{-/-}-Mäusen im betreffenden Organ detailliert zu untersuchen, wurden histopathologische Analysen vom Colon durchgeführt. Dazu wurden die Colons an Tag null und acht nach DSS-Gabe präpariert, in Paraffin eingebettet und die Gewebsschnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Die Ergebnisse der H&E-Färbungen zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Genotypen (Abb. 4-5). An Tag null weisen sowohl WT- als auch BPI^{-/-}-Mäuse keine histopathologischen Veränderungen auf. Die Architektur des Colons ist

vollkommen intakt und eine Entzündung ist, wie erwartet, nicht zu erkennen (Abb. 4-5 A). Nach acht Tagen führt die DSS-Gabe zu einer verstärkten Inflammation in beiden Genotypen, die jedoch bei den BPI^{-/-}-Mäusen stärker ausgeprägt ist. Es ist bei den BPI-defizienten Mäusen eine deutliche Zerstörung des Epithels erkennbar. Die Submukosa ist bei beiden Genotypen verdickt. Die Kryptenarchitektur ist gestört und es kommt zur Verkürzung bis hin zum vollständigen Verlust der Krypten (Abb. 4-5 B). Des Weiteren weisen beide Genotypen Ödeme in der Submukosa auf. Die Klassifizierung nach Hartmann et al. der untersuchten Gewebeschnitte zeigt einen signifikant erhöhten Pathologie-Score der BPI-defizienten Mäuse an Tag acht (Abb. 4-5 C) (Hartmann et al., 2000).

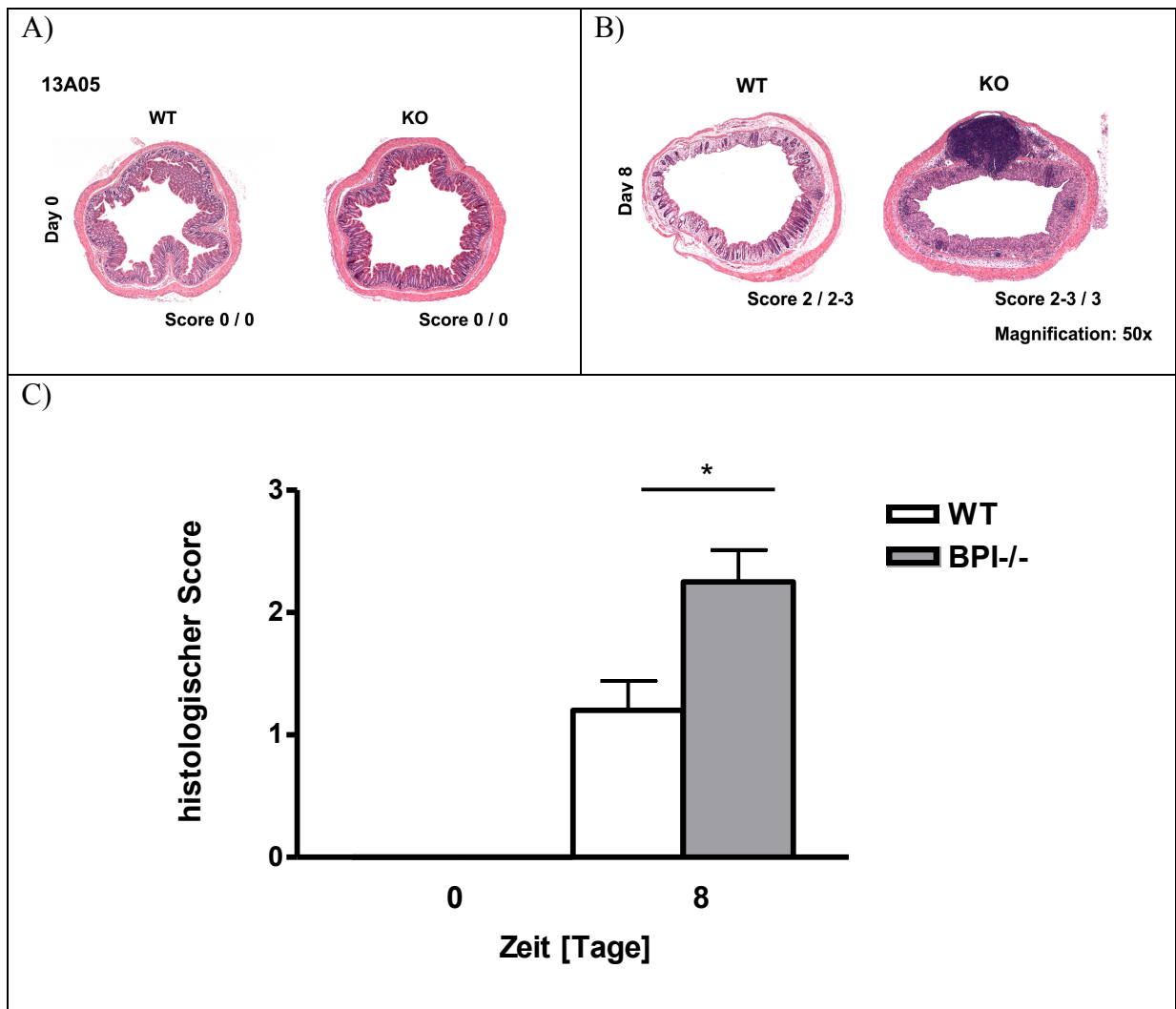


Abb. 4-5 H&E-Färbungen des Colon von WT- und BPI^{-/-}-Mäusen

Die DSS-Kolitis wurde durch Gabe von 1,75 % DSS im Trinkwasser induziert, an Tag null (A) und acht (B) das Colon präpariert und mittels 4 % PFA fixiert. Die Colons wurden in Paraffin eingebettet und Gewebeschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit H&E gefärbt und nach Hartmann et al. klassifiziert (Hartmann et al., 2000). C) zeigt den histologischen „Score“ an Tag null und acht von WT (weiße Balken) und BPI^{-/-} (graue Balken) Mäusen (durchgeführt von Dr. Leticia Quintanilla-Fend, Institut für Pathologie Tübingen). n=5, p < 0,05

Die histopathologischen Untersuchungen des Colon zeigen, dass BPI-defiziente Mäuse eine deutlich stärkere Entzündungsreaktion im betreffenden Organ nach einer DSS-induzierten Kolitis aufweisen als WT-Mäuse.

Nachdem die pathologischen Befunde für einen stärkeren Kolitisverlauf in BPI-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen sprechen, sollte die Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Colon untersucht werden. Dazu wurden Colontkulturen angelegt und die Überstände mittels ELISA analysiert. Die Untersuchungen zur Zytokinproduktion während der DSS-induzierten Kolitis zeigen einen zeitabhängigen Anstieg der IL-6- sowie IL-1 β -Sekretion (Abb. 4-6). IL-6 wird in Korrelation mit der Ausprägung der Kolitis sowohl in WT- als auch BPI^{-/-}-Mäusen verstärkt ausgeschüttet. So sind an Tag acht ca. 75 ng/mL IL-6 im Überstand nachweisbar (Abb. 4-6 A). Dagegen weist die IL-1 β -Produktion zwischen beiden Genotypen Unterschiede auf. Isolierte Darmzellen von BPI^{-/-}-Mäuse sekretieren am Tag acht der induzierten DSS-Kolitis fast die doppelte Menge an IL-1 β im Vergleich zu Zellen, die zum gleichen Zeitpunkt von Wildtyp-Mäusen isoliert wurden (Abb. 4-6 B). In Korrelation zu dem Gewichtsverlauf sowie der Colonlänge zeigt sich auch bei der Zytokinproduktion eine reduzierte Sekretion beider Zytokine an Tag 12 (Abb. 4-6).

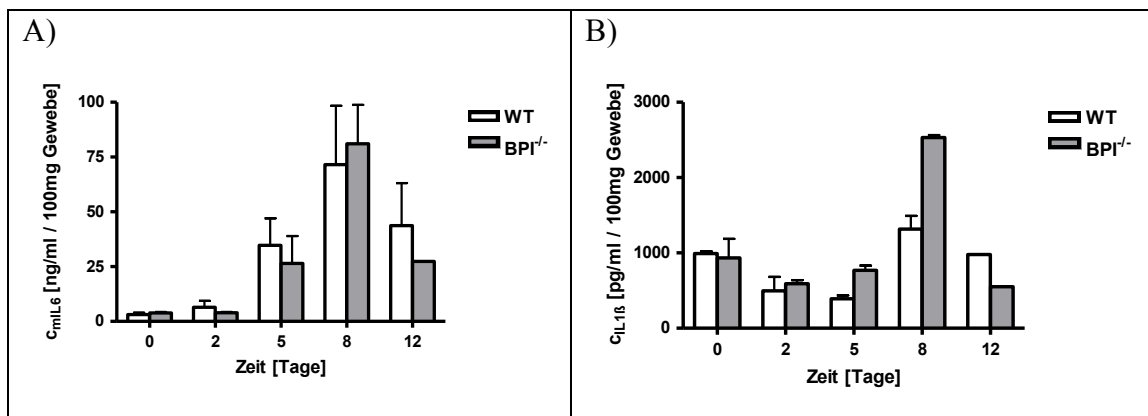
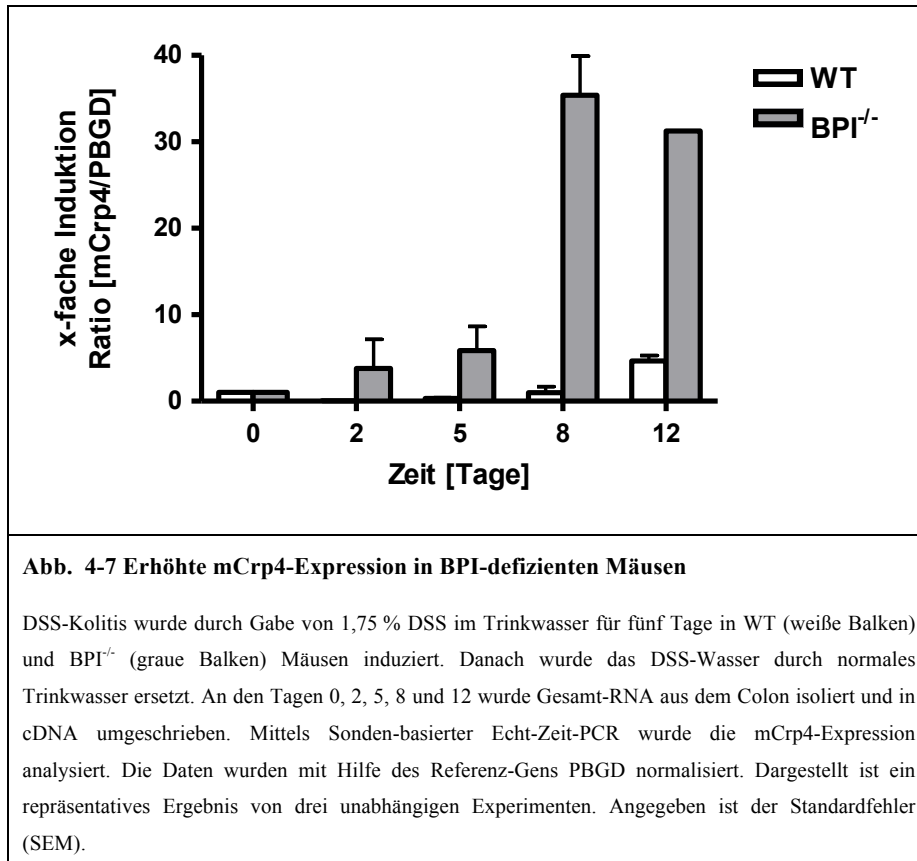


Abb. 4-6 Zytokinproduktion während DSS-Kolitis in WT- und BPI^{-/-}-Mäusen

Induktion einer Kolitis durch Gabe von 1,75 % DSS im Trinkwasser für fünf Tage in WT (weiße Balken) und BPI^{-/-} (graue Balken) Mäusen. Danach wurde das DSS-Wasser durch normales Trinkwasser ersetzt. Nach 0, 2, 5, 8 und 12 Tagen wurde das Colon präpariert und für 24 h in RPMI-komplett kultiviert. Der Überstand wurde abgenommen und die Produktion von IL-6 (A) und IL-1 β (B) im spezifischen ELISA gemessen. Angegeben ist die Zytokinmenge pro 100 mg Gewebe. Die Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. (\pm SEM; n=6)

Neben der Induktion der mRNA-Expression von mBPI während einer DSS-induzierten Kolitis in WT-Mäusen (Abb. 4-3), lässt sich auch eine gesteigerte mRNA-Synthese

des Defensins mCrp4 nachweisen. So steigt die Crp4-Expression von WT-Mäusen während einer akuten Kolitis auf das Fünffache an. BPI-defiziente Mäuse zeigen nach Tag acht sogar eine 35-fach erhöhte mRNA-Synthese (Abb. 4-7).



Aus diesen Experimenten schließen wir, dass der Verlust der Expression von BPI zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion und Expression von AMPs im Colon von Mäusen während einer DSS-Kolitis führt.

4.4 BPI hat keinen Einfluss auf die Expression von zytoprotektiven Hitzeschockproteinen

Ob der beobachtete Phänotyp der stärkeren Kolitis in BPI-defizienten Mäusen mit einer reduzierten Expression von zytoprotektiven Faktoren im Darmgewebe im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zusammenhängt, wurde im Folgenden untersucht. Dazu wurde die HSP70-Expression während einer DSS-induzierten Kolitis analysiert. Die Hitzeschockprotein-Familie HSP25 und HSP70 haben wichtige zytoprotektive Eigenschaften, unter anderem in intestinalen Epithelzellen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellstress und sind in der Lage, Proteine zu stabilisieren und an ihr Ziel zu leiten (Malago et al., 2002). Die Expression von HSP70 wurde aus

den Colonproben mit Hilfe eines Immunoblots untersucht. In Abbildung 4-8 ist die Bandenintensität in % von HSP70 dargestellt. HSP70 wird im Colon während einer DSS-induzierten Kolitis an Tag acht herunterreguliert. Nach 12 Tagen steigt die Expression wieder an. Zwischen den beiden Genotypen ist kein Unterschied in der Proteinsynthese von HSP70 nachweisbar. BPI scheint daher keinen Einfluss auf die zytoprotektiven Eigenschaften des Hitzeschockproteins HSP70 zu haben.

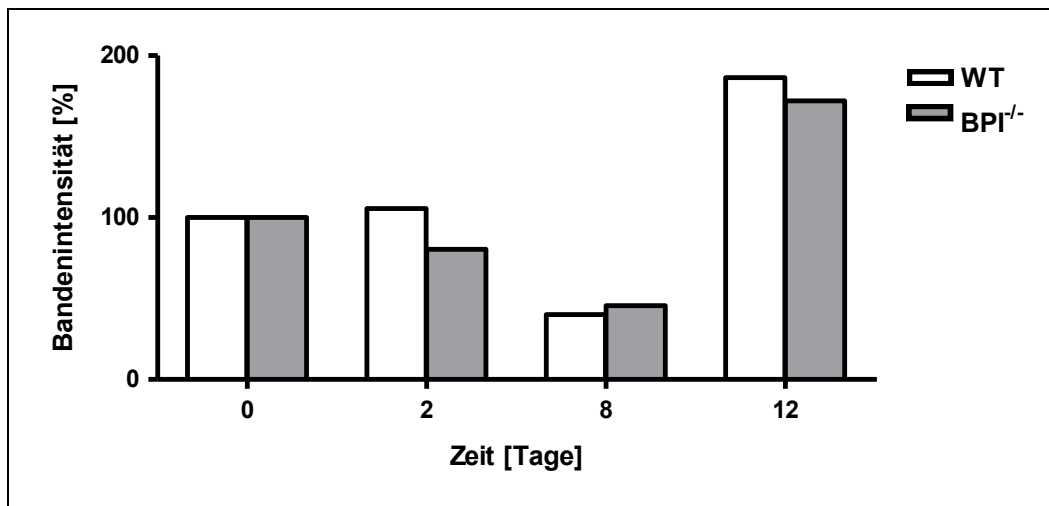


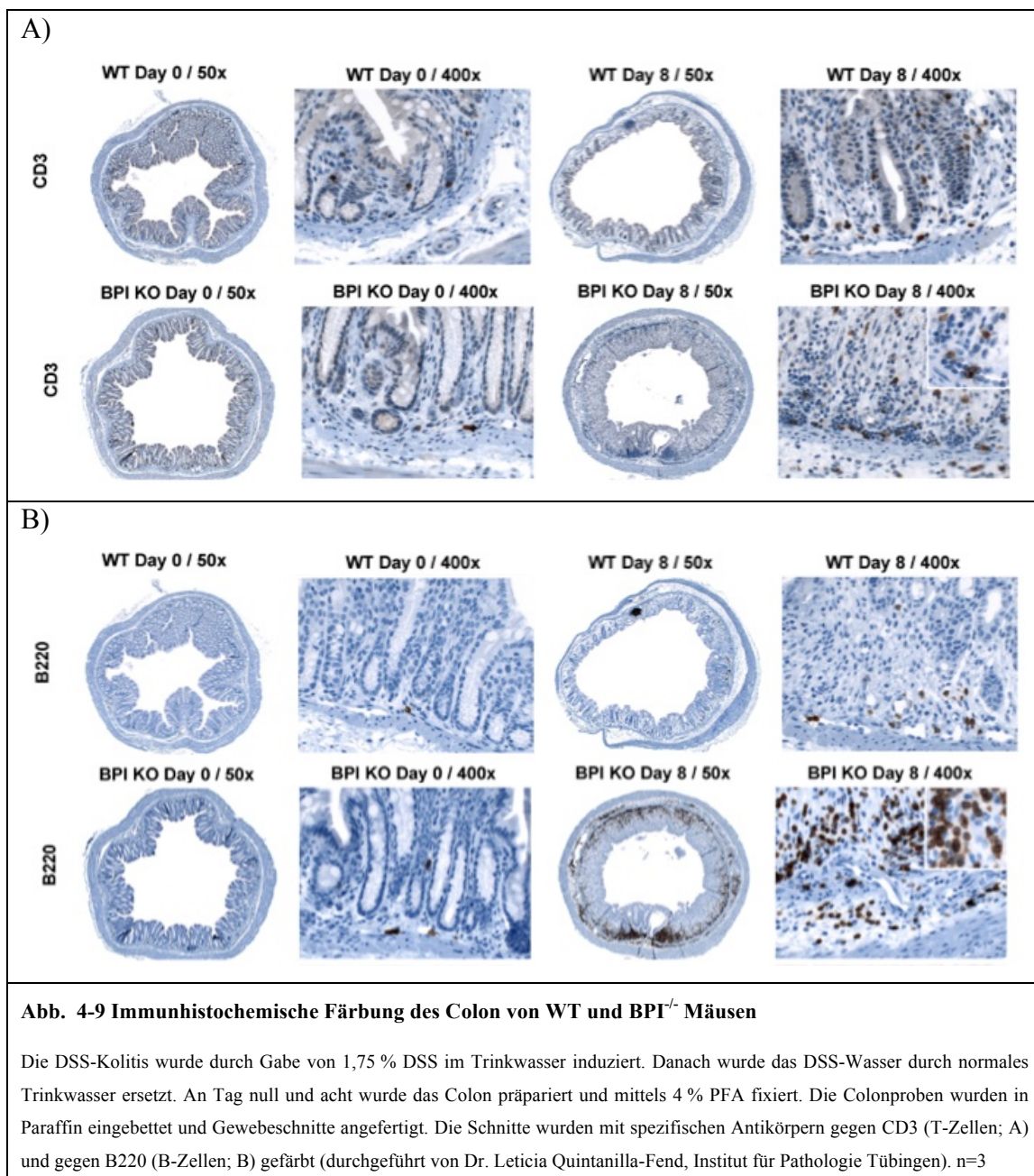
Abb. 4-8 HSP70-Expression während DSS-Kolitis in WT- und BPI^{-/-}-Mäusen

Induktion einer Kolitis durch Gabe von 1,75 % DSS im Trinkwasser in WT (weiße Balken) und BPI^{-/-} (graue Balken) Mäusen. Danach wurde das DSS-Wasser durch normales Trinkwasser ersetzt. Die Colonproben wurden an den Tagen 0, 2, 8 und 12 präpariert und Proteinlysate hergestellt. Nach SDS-PAGE wurden die Proben mit einem HSP70 spezifischen Antikörper im Immunoblot untersucht. Über die Bindung eines Zweitantikörpers, der Peroxidase gekoppelt war, wurde die Antikörperbindung auf der Membran mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Detektion und Berechnung der Bandenintensität in % erfolgte am Gel Doc™ EZ System (BioRad). Die Daten wurden mit Hilfe der Bandenintensität des Referenz-Gens Aktin normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

4.5 Erhöhte Anzahl von Entzündungszellen in BPI^{-/-}-Mäusen während DSS-induzierter Kolitis

Die unterschiedlich ausgeprägte Kolitis in BPI-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach DSS-Gabe hat möglicherweise Einfluss auf die Zusammensetzung und Anzahl der Entzündungszellen im Darm. Um dieses zu untersuchen, wurden die Colons von WT und BPI^{-/-} Mäusen immunhistochemisch analysiert. Dazu wurden Gewebeschnitte mit spezifischen Antikörpern gegen CD3, zum Nachweis von T-Zellen (Abb. 4-9 A), gegen B220, als Marker für B-Zellen (Abb. 4-9 B), gegen Mac3, zur Detektion von Makrophagen (Abb. 4-10 A) und gegen MPO, um neutrophile Granulozyten nachzuweisen, (Abb. 4-10 B) angefärbt. An Tag null

befinden sich im Colon der beiden Mausstämme nur vereinzelte T-Zellen und B-Zellen (Abb. 4-9 A und B). Dahingegen zeigt sich an Tag acht eine erhöhte Infiltration von CD3-positiven T-Zellen in der Mukosa sowohl in WT- als auch in BPI^{-/-} Mäusen. Die Anzahl an T-Zellen in BPI^{-/-} Mäusen ist höher als in WT-Mäusen. Die Submukosa weist nur wenige infiltrierte Zellen auf (Abb. 4-9 A). Die Färbungen von B-Zellen zeigt ein ähnliches Infiltrationsmuster wie bei den T-Zellen auf. Jedoch befinden sich deutlich mehr B220-positive B-Zellen in der Mukosa des Colons nach DSS-induzierter Kolitis an Tag acht als T-Zellen (Abb. 4-9 B).



Sowohl in dem Colon von WT als auch BPI^{-/-} Mäusen lassen sich an Tag null keine

Makrophagen und neutrophile Granulozyten nachweisen (Abb. 4-10 A und B). An Tag acht weisen beide Genotypen eine erhöhte Infiltration von Mac3-positiven Zellen auf. Die Anzahl an Makrophagen ist jedoch in BPI^{-/-} Mäusen höher. Makrophagen infiltrierten in die Mukosa, Submukosa und in die darunterliegenden Muskelschichten (Abb. 4-10 A). Bei der Analyse der neutrophilen Granulozyten an Tag acht zeigt sich nur eine geringe Infiltration in beiden Genotypen, wobei die Anzahl in BPI^{-/-} Mäusen auch hier höher ist. Hauptsächlich ist eine Infiltration in die Mukosa und Submukosa zu erkennen (Abb. 4-10 B).

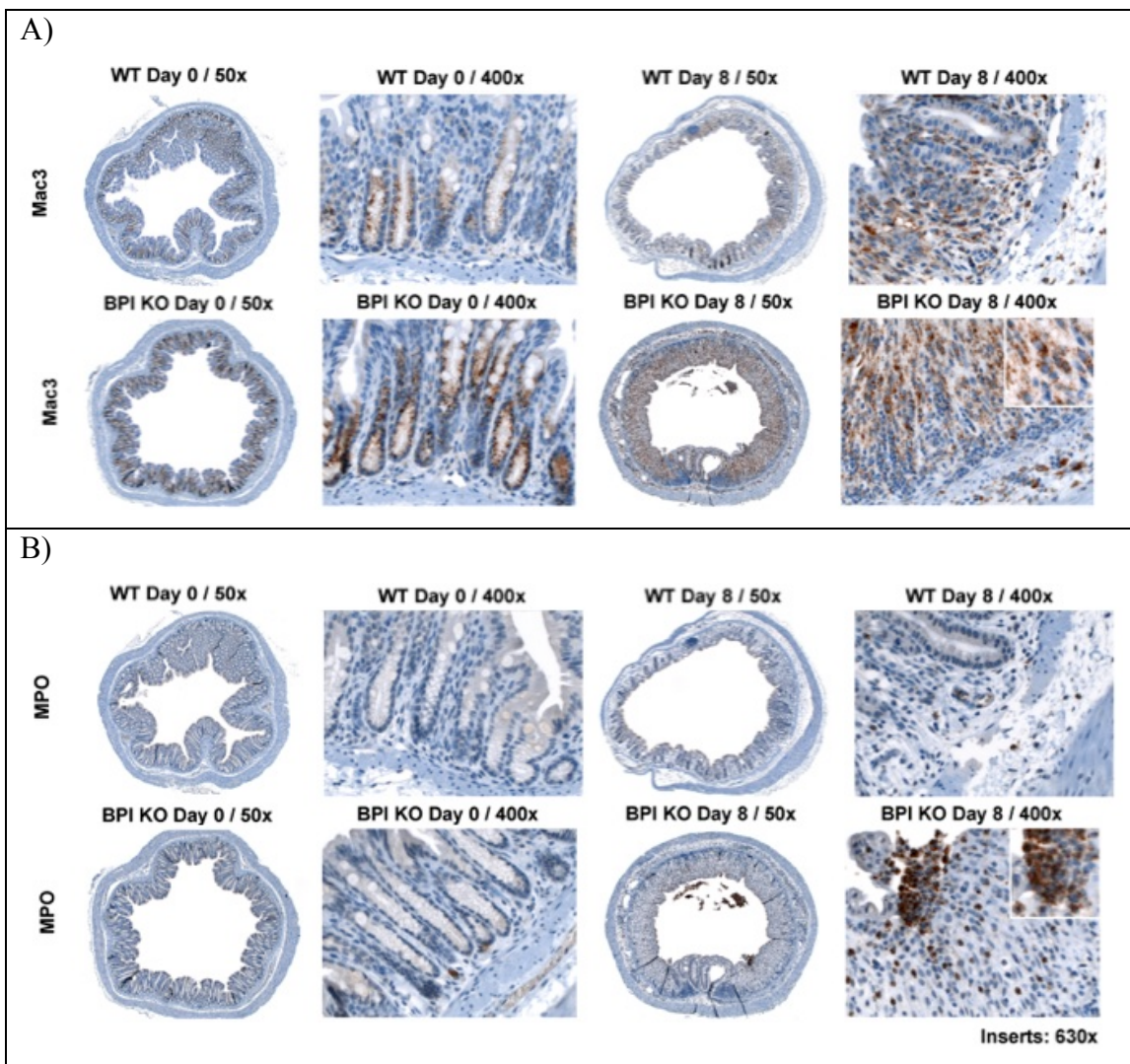


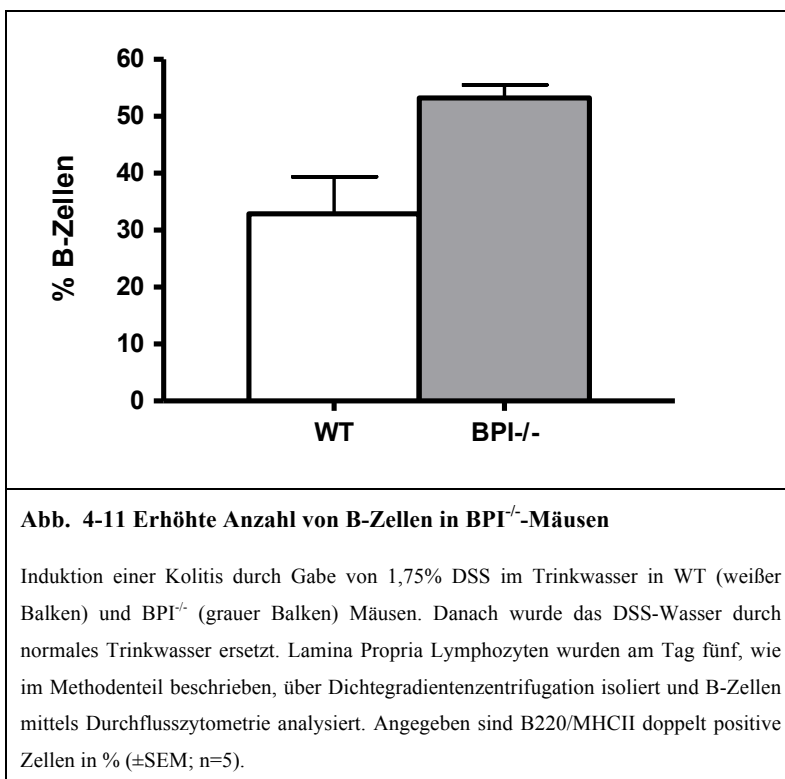
Abb. 4-10 Immunohistochemische Färbung des Colon von WT und BPI^{-/-} Mäusen

Die DSS-Kolitis wurde durch Gabe von 1,75 % DSS im Trinkwasser induziert. Danach wurde das DSS-Wasser durch normales Trinkwasser ersetzt. An Tag null und acht wurde das Colon präpariert und mittels 4 % PFA fixiert. Die Colonproben wurden in Paraffin eingebettet und Gewebeschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Mac3 (Makrophagen; A) und gegen MPO (Neutrophile Granulozyten; B) gefärbt (durchgeführt von Dr. Leticia Quintanilla-Fend, Institut für Pathologie Tübingen). n=3

Es zeigt sich, dass im Colon von BPI-defizienten Mäusen während der DSS-Kolitis

mehr Entzündungszellen (B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten) vorliegen als in Wildtyp-Mäusen.

Zusätzlich wurden verschiedene Zellpopulationen von isolierten Lamina Propria-Lymphozyten an Tag fünf einer Kolitis mittels Durchflußzytometer analysiert (Daten nicht gezeigt / Abb. 4-11). Konform mit der histologischen Auswertung war der Nachweis der erhöhten Anzahl von B-Zellen in den BPI^{-/-}-Mäusen. Hier konnten 20 % mehr Zellen in der Lamina Propria nachgewiesen werden als bei den WT-Mäusen (Abb. 4-11).



Um die mögliche Ursache der erhöhten Anzahl von B-Zellen in BPI^{-/-}-Mäusen zu untersuchen, wurde der Einfluss von BPI und LPS auf das Wachstum von B-Zellen mit Hilfe eines Proliferationstest analysiert. Dazu wurden B-Zellen aus der Milz von WT-Mäusen isoliert, mit CFSE markiert und mit LPS, natürlich gereinigtem BPI (rBPI) oder LPS und rBPI für 72 h stimuliert.

Werden die Zellen mit LPS stimuliert, so erhöht sich die Proliferationsrate von 62 % (Abb. 4-12 A) auf 89,7 % (Abb. 4-12 B). Bei Zugabe von BPI, wird die Proliferation um 20 % gehemmt (Abb. 4-12 C). Stimuliert man die isolierten B-Zellen mit LPS und rBPI, so neutralisiert BPI das LPS und die B-Zellproliferation wird inhibiert (Abb. 4-

12 D). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass ein Fehlen der Expression von BPI dazu führt, dass z.B. LPS nach der Zerstörung des Darmepithels durch DSS nicht neutralisiert werden kann und zu einer B-Zell-Proliferation in der Lamina Propria führt.

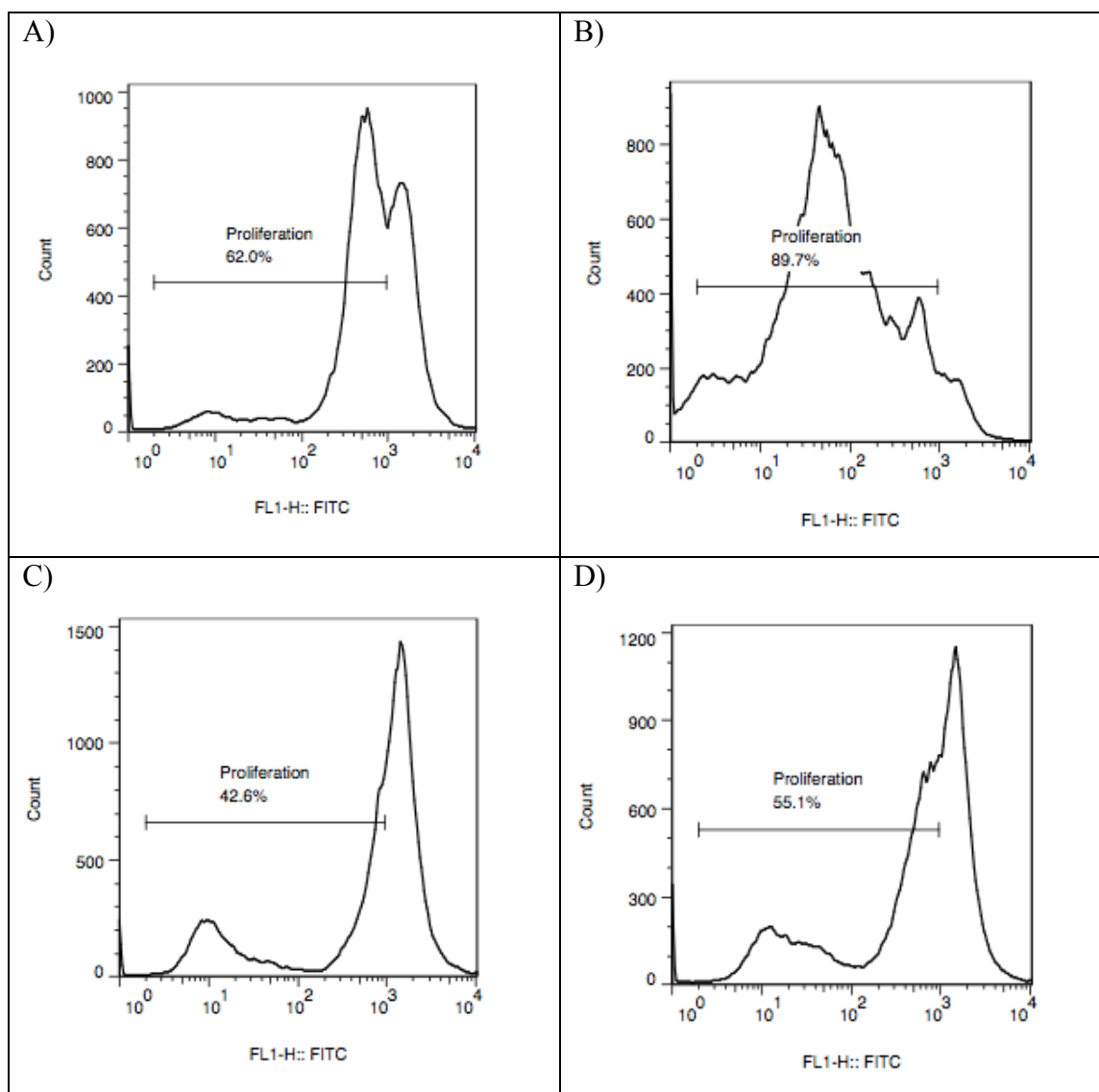


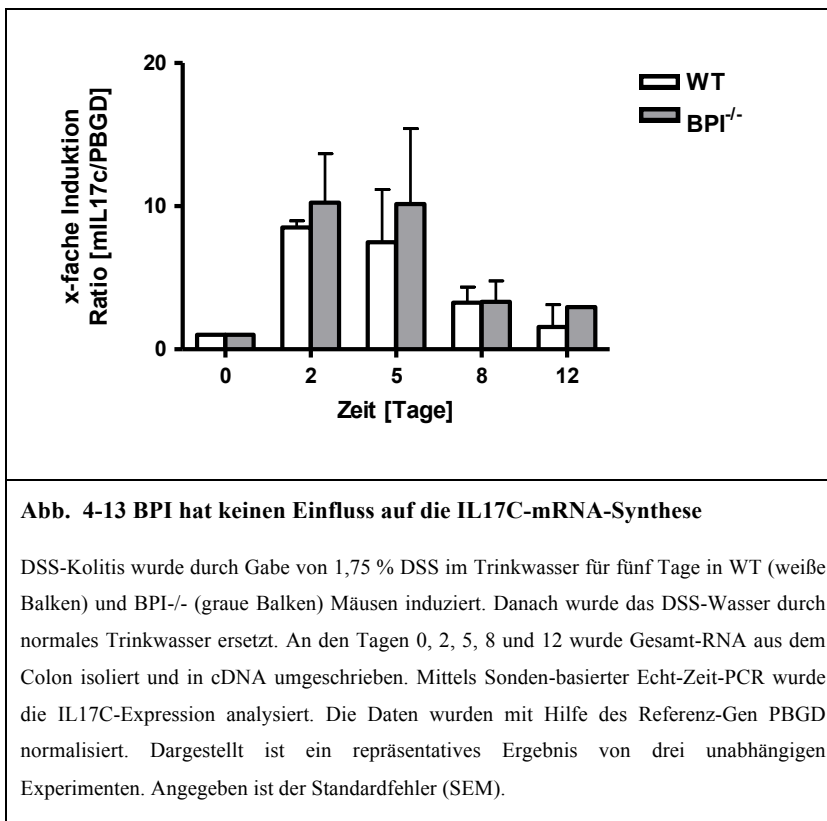
Abb. 4-12 BPI neutralisiert LPS und inhibiert B-Zell-Proliferation

1×10^7 B-Zellen wurden aus der Milz von WT-Mäusen isoliert und mit CFSE markiert. Anschließend wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen/mL für 72 h mit 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS (B), 5 $\mu\text{g/mL}$ BPI (C) oder 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS und 5 $\mu\text{g/mL}$ BPI (D) stimuliert und bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte B-Zellen (A). Die Proliferation wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

4.6 BPI-Defizienz hat keinen Einfluss auf den IL-17C Signalweg

IL-17C ist ein Mitglied der IL-17-Familie, welches durch bakteriellen Kontakt von Epithelzellen sezerniert wird. Es ist in der Lage, die Produktion von antimikrobiellen Peptiden, proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen zu induzieren. IL-17C spielt somit eine wichtige Rolle bei der mukosalen Immunabwehr (Ramirez-Carrozzi et al., 2011). Ob BPI einen Einfluss auf die Expression von IL-17C während einer DSS-induzierten Kolitis hat und dies den beobachteten Phänotyp der BPI-defizienten Maus während einer Kolitis erklären könnte, wurde mit Hilfe der qRT-PCR analysiert (Abb. 4-13).

Die IL-17C mRNA-Synthese wird durch die Gabe von DSS sowohl bei WT- als auch BPI^{-/-}-Mäusen induziert. Dabei steigt die IL17-C mRNA-Expression an Tag fünf bis auf das acht- bzw. 10-fache an und reduziert sich mit Nachlassen der Kolitis wieder auf die ein- bis zweifache Induktion. Zwischen den beiden Genotypen ist kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Demzufolge hat das Fehlen der BPI-Expression keinen Einfluss auf die IL-17C mRNA-Synthese und somit auf den IL-17C Signalweg.



4.7 BPI-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Mikroflora

Als einen weiteren Aspekt der Ätiologie von CED wird die Dysregulation der intestinalen Mikrobiota angenommen (Chassing et al., 2001). Ob sich die Defizienz von BPI auf die Zusammensetzung der Mikroflora auswirkt und damit ein Grund für die erhöhte Suzeptibilität der DSS-induzierten Kolitis ist, sollte mittels Mikrobiomanalyse untersucht werden. Aus diesem Grunde wurde der Darminhalt von Dünndarm, Caecum und Colon mit Hilfe der quantitativen PCR (16S rDNA-Analyse) untersucht. Dabei haben wir uns auf die beiden Bakterienstämme *Firmicutes* und *Bacteroidetes* beschränkt. Diese beiden Phyla machen über 80% der gesamten Darmbakterien aus (Salzmann, 2002). Innerhalb der *Firmicutes* wurden die Bakterienordnungen *Lactobacillus species* und *SFB* (*segmented filamentous bacteria*) und innerhalb der *Bacteroidetes* die Unterordnungen *MIB* (*mouse intestinal bacteroides*) und *Bacteroides* analysiert (durchgeführt von Dr. Vera Schwierzeck).

Weder im Dünndarm, Caecum (Daten nicht gezeigt) noch im Colon (Abb. 4-14) sind signifikante Unterschiede zwischen den WT- und BPI^{-/-} - Mäusen zu erkennen. Es konnte in allen untersuchten Proben und Bakterienspezies jeweils ähnlich viele Bakterienkopien nachgewiesen werden. So ließen sich z.B im Colon von WT- bzw. BPI^{-/-} -Mäusen ca. 10^{11} - 10^{12} 16S rDNA Kopien/ng DNA der Bakterien-Phyla *Bacteroidetes* nachweisen (Abb. 4-14).

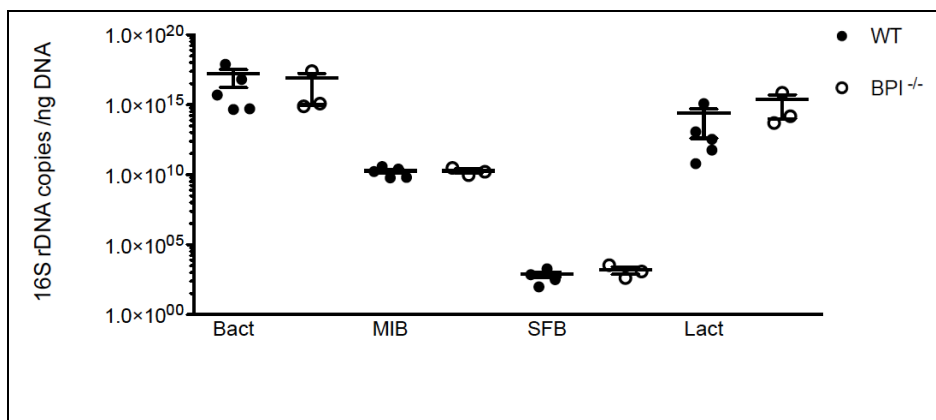


Abb. 4-14 BPI Defizienz hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Mikroflora

16S rDNA-Analyse vom Darminhalt des Colon von WT und BPI^{-/-} - Mäusen. Die DNA aus dem Stuhl von WT (●) und BPI^{-/-} (○) Mäusen wurde mit Hilfe QIAmp® DNA Stool Kit (Qiagen) isoliert und mittels quantitativer PCR auf die Bakterienordnungen *Bacteroides* (*Bact*) und *mouse intestinal bacteroides* (*MIB*) und die Unterordnungen *segmented filamentous bacteria* (*SFB*) und *Lactobacillus species* (*Lact*) untersucht (durchgeführt von Dr. Vera Schwierzeck, Universität Freiburg)
n=10

5 Diskussion

5.1 Expression und Regulation von murinem BPI in Darmepithelzellen

AMP spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase im Darm (Ouelette et al., 2005). In den Epithelzellen des Darms und den Lieberkühn'schen Krypten werden viele dieser AMP exprimiert, welche einen direkten Einfluss auf die lokale Immunabwehr gegen Pathogene haben. Zunächst wurde untersucht, ob murines BPI von Darmepithelzellen exprimiert wird und möglicherweise durch bakterielle Komponenten regulierbar ist.

Die Analysen der embryonalen Epithelzelllinie mIC_{c12}, die mit verschiedenen TLR-Liganden stimuliert wurde, zeigten, dass die mRNA-Synthese von murinem BPI regulierbar ist (Abb. 4-1). Die Responsivität der embryonalen Epithelzelllinie mIC_{c12} gegenüber dem TLR-Liganden LPS konnte bereits von Hornef et al. demonstriert werden (Hornef et al., 2002).

Nachdem die Expression und Regulation von murinem BPI *in vitro* nachgewiesen werden konnte, wurden Untersuchungen an *ex vivo* isolierten Darmepithelzellen von WT- und BPI-defizienten Mäusen durchgeführt. In Korrelation zu der Epithelzelllinie mIC_{c12}, konnte auch in den *ex vivo* isolierten Darmepithelzellen die Expression der mBPI-mRNA gezeigt werden. Jedoch war die Expression von mBPI auf einem niedrigen Niveau und konnte auch nicht durch die verschiedenen TLR-Stimuli induziert werden (Abb. 4-2). Bereits in Arbeiten von Canny et al. wurde beschrieben, dass BPI im Darm von Mäusen exprimiert wird (Canny et al., 2006). Bei dieser Arbeit ist allerdings kritisch anzumerken, dass der Nachweis von BPI im Mäusedarm mit einem ELISA geführt wurde, der human spezifisch sein soll. Die im ELISA verwendeten Antikörper wurden in der Maus hergestellt, deshalb ist die Kreuzreaktivität der Antikörper im Prinzip möglich, aber nach Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe nicht gegeben. Der Kontakt der Lieberkühnschen Krypten mit Bakterien führt zur verstärkten Freisetzung reifer α -Defensinen (Ayabe et al., 2000). Solche Cryptdine werden von den Panethzellen der Krypten als unreife Vorform sezerniert und durch die Matrixmetalloproteinase 7 (MMP7; Matrilysin) proteolytisch aktiviert. Nach dem Bakterienkontakt wird die Prozessierung der Cryptdine auf noch ungeklärte Weise durch MMP7 verstärkt, sodass die Erhöhung der Konzentration der aktiven Cryptdine nicht auf transkriptioneller Ebene erfolgt (Ayabe et al., 2000).

Die Unterschiede in der TLR-Responsivität zwischen den *ex vivo* isolierten

Darmepithelzellen und der embryonalen Epithelzelllinie mIC_{c12} könnte auf die Negativregulation der TLR-Signaltransduktion in primären Epithelzellen zurückzuführen sein. Diese Negativregulation ist notwendig, um überschießende Immunreaktionen und Autoimmunität durch kommensale Bakterien im Darm zu vermeiden (Liew et al., 2005). Dabei können z.B. extrazellulär auftretende lösliche TLRs die Signaltransduktion von membranständigen Rezeptoren inhibieren. So interagiert löslicher TLR4 (*soluble TLR4*, sTRL4) möglicherweise mit den Korezeptoren CD14 und MD2 und verhindert somit deren Bindung an TLR4 (Liew et al., 2005). Dieser Effekt ist in der embryonalen Epithelzelllinie noch nicht ausgeprägt, da die negativ regulierenden Mechanismen der TLR4-Erkennung in Darmepithelzellen erst postnatal ausgebildet werden. Dadurch ist die LPS-Responsivität in der Epithelzelllinie noch vollständig erhalten (Hornef et al., 2002).

5.2 Verstärkte BPI-Expression während DSS-induzierter Kolitis

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind durch rezidivierende Entzündungen in verschiedenen Bereichen des Magen-Darm-Traktes gekennzeichnet. Morbus Crohn und *Colitis ulcerosa* stellen dabei die beiden häufigsten Vertreter dar (Podolksy, 2002). Die Pathogenese und Ätiologie ist bis heute weitestgehend ungeklärt. Ein multimodales Zusammenspiel von Mikroflora sowie immunologischen, genetischen und Umweltfaktoren gilt dabei als ätiopathogenetisch (Podolksy, 2002; Scaldaferri et al., 2007).

Auch AMP können bei der Pathogenese von CED eine Rolle spielen, da sie in der Lage sind, Entzündungsreaktionen zu beeinflussen. Ob das AMP BPI eine Funktion bei der Regulation von Entzündungsprozessen und der Homöostase während einer Darmerkrankung einnimmt, sollte mit Hilfe des DSS-Modells untersucht werden.

Während einer DSS-induzierten Kolitis konnte BPI in WT-Mäusen verstärkt nachgewiesen werden (Abb. 4-3). Diese induzierbare Expression während einer Entzündung lässt sich bei vielen antimikrobiellen Peptiden nachweisen. So werden die Defensine, welche eine wichtige Funktion bei der Immunabwehr im Darm einnehmen, neben den konstitutiv exprimierten AMPs auch in induzierbare AMPs eingeteilt. Während einer Infektion oder Entzündungsreaktion werden die induzierbaren Defensine verstärkt exprimiert, um eine Immunantwort einzuleiten (Ho et al., 2013). Das humane beta-Defensin 2 wird im gesunden Probanden im Colon nur sehr schwach exprimiert. Bei Patienten mit CED hingegen kann man eine signifikante Steigerung der

Expression im Colonepithel nachweisen (Wehkamp et al., 2002). Auch in Mäusen lassen sich induzierbare AMPs detektieren. Rahman et al. konnten zeigen, dass während einer DSS-induzierten Kolitis das Maus beta-Defensin 3 verstärkt exprimiert wird (Rahman et al., 2011). Nicht nur bei CED spielen AMP eine entscheidende Rolle. So ist z.B. auch ein Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Expression von BPI bei Patienten mit Mukoviszidose feststellbar (Aichele et al., 2006).

Durch den Nachweis der gesteigerten Expression des antimikrobiellen Proteins BPI während einer DSS-induzierten Kolitis, haben wir die Hypothese aufgestellt, dass BPI eine zentrale Rolle bei der CED einnimmt. Diese Hypothese wird durch Befunde, die bei entzündlichen Darmerkrankungen beim Menschen gemacht wurden, unterstützt. So führen Einzelnukleotid-Polymorphismen in BPI zu einem erhöhten Risiko gegenüber entzündlichen Darmerkrankungen (Akin et al., 2011). Darüber hinaus konnten Stoffel et al. in Patienten mit CED eine erhöhte Anzahl von Autoantikörper gegen BPI nachweisen (Stoffel et al., 1996).

5.3 BPI-defiziente Mäuse entwickeln eine starke DSS-induzierte Kolitis

Nachdem bekannt war, dass es während einer DSS-induzierten Kolitis zu einer verstärkten Expression von BPI kommt, sollte die Bedeutung von BPI bei CED näher analysiert werden. Dazu wurde in WT- als auch in BPI^{-/-}-Mäusen eine DSS-Kolitis induziert und deren Phänotyp verglichen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass BPI^{-/-}-Mäuse susceptibler gegenüber einer DSS-Kolitis sind (Abb. 4-4 / 4-5). Dies zeigt sich sowohl durch eine erhöhte Gewichtsabnahme und deutlich längeren Erholungsphasen, in der stärkeren Verkürzung des Colon als auch bei den histologischen Untersuchungen (Abb. 4-4 / 4-5). Das Fehlen des antimikrobiellen Proteins BPI hat offensichtlich einen starken Einfluss auf den Verlauf einer Kolitis.

Ein möglicher Grund könnte sein, dass durch das Fehlen von BPI eine erhöhte Bakterienlast auf dem Darmepithel vorliegt. Nach Schädigung des Epithels durch die DSS-Gabe könnten mehr Bakterien ins Gewebe übertreten. Dadurch könnte es zu einer verzögerten Eliminierung von Pathogenen kommen, was eine verstärkte Störung der Funktion des Epithels zur Folge hat. Die Darmbarriere kann somit durchbrochen werden und eine verstärkte Inflammation wird ausgelöst. Diese Hypothese wird auch für die Wirkung von Defensinen in Arbeiten von Wehkamp et al. und Salzmann et al. beschrieben (Wehkamp et al., 2005; Salzmann et al., 2007). Eine verringerte

Cathelicidinkonzentration an der Oberfläche des Epithels begünstigt die Besiedlung von Bakterienstämmen, was im Anschluss die bakterielle Invasion in das subepitheliale Gewebe ermöglicht (Iimura et al., 2005). MMP7^{-/-}-Mäuse, denen die Matrixmetalloprotease Matrilysin fehlt, welche Cryptdine in ihre aktive Form spaltet, synthetisieren nur die inaktive Pro-Form der Cryptdine. Sie weisen durch den verminderten Defensinspiegel eine geringere antimikrobielle Aktivität auf und brauchen deutlich länger, um gegen eine Infektion mit *E.coli* anzukämpfen. Des Weiteren zeigen MMP7^{-/-}-Mäuse eine höhere Infektanfälligkeit gegenüber einer oralen Salmonelleninfektion im Vergleich zu WT-Mäusen (Wilson et al., 1999). Diese Arbeiten verdeutlichen, welche zentrale Rolle antimikrobielle Peptide bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Darms zwischen Mikroorganismen auf der einen Seite und des Darmepithels auf der anderen Seite einnehmen. Ob der Verlust der Expression von BPI dazu führt, dass die Epithelschranke gestört ist und Bakterien die Epithelbarriere leichter überwinden können, muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Die Analysen der Expression proinflammatorischer Zytokine im Colon zeigte eine erhöhte Sekretion von sowohl IL-6 als auch IL-1 β in beiden Mausstämmen nach DSS-Gabe (Abb. 4-6).

IL-6 ist ein typisches proinflammatorisches Zytokin, welches während der akuten Phase einer Entzündung produziert und sekretiert wird. IL-6 wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Zellpopulationen hergestellt. Bei zahlreichen Erkrankungen kann man eine verstärkte IL-6 Ausschüttung detektieren. So konnte auch bei Patienten mit CED eine gesteigerte Produktion nachgewiesen werden (Reimund et al., 1996).

In den hier dargestellten Experimenten wurde IL-6 sowohl bei WT- als auch bei den BPI^{-/-} Mäusen durch die DSS-induzierte Kolitis verstärkt sezerniert, jedoch zeigen beide Genotypen trotz unterschiedlicher Suszeptibilität gegenüber der Kolitis ähnliche Konzentrationen im Colon. Durch die BPI-Defizienz sind nur die Zellen betroffen, die BPI exprimieren. Nicht alle Zelltypen des Darmepithels und der infiltrierenden Leukozyten sind betroffen. Dies könnte in der Summe zu keinem messbaren Unterschied in der IL-6-Synthese im Darmepithel während der Kolitis führen. Ob IL-6 systematisch im Verlauf der DSS-Kolitis in den beiden untersuchten Mausstämmen unterschiedlich exprimiert wird, bleibt unbeantwortet.

Bei Analyse der IL-1 β Sekretion von WT und BPI^{-/-}-Mäusen zeigte sich eine deutlich gesteigerte Produktion in den gendefizienten Mäusen (Abb. 4-6 B). Neben IL-6 ist

auch IL-1 β ein bedeutendes proinflammatorisches Zytokin, welches hauptsächlich von stimulierten Makrophagen und Monozyten produziert wird (March et al., 1985). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort und bei akuten sowie chronischen Erkrankungen. Auch bei CED scheint IL-1 β durch eine veränderte Produktion und mukosale Konzentration eine wichtige Funktion bei der Pathogenese einzunehmen (Casini-Raggi et al., 1995; Dinarello, 1996). Sowohl bei Patienten mit CED, als auch in Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis konnte eine gesteigerte IL-1 β -Produktion nachgewiesen werden (Capello et al., 1992; Villegas et al., 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Inhibieren von IL-1 β durch einen IL-1 β -Antikörper zu einem milderen Kolitisverlauf führt (Arai et al., 1998). Die auf fast das doppelte erhöhte IL-1 β -Konzentration in den BPI^{-/-}-Mäusen könnte maßgeblich am schwereren Verlauf der Kolitis beteiligt sein (Abb. 4-6 B). Dies korreliert auch mit den Daten der immunhistochemischen Färbungen, bei denen in den BPI-defizienten Mäusen deutlich mehr Makrophagen in die Mukosa, Submukosa und Muskelschichten infiltrieren (Abb. 4-10 A). Die erhöhte Zellzahl könnte direkt mit einer verstärkten IL-1 β -Synthese zusammenhängen und zu einem schwereren Verlauf der Kolitis beitragen.

Eine weitere Erklärung für die erhöhte Empfänglichkeit gegenüber der DSS-induzierten Kolitis in BPI^{-/-}-Mäusen könnte sein, dass BPI einen Einfluss auf die Expression von zytoprotektiven Faktoren hat, was die stärkere Zerstörung des Darmepithels in BPI^{-/-}-Mäusen zur Folge haben könnte und damit in eine vergrößerte Interaktionsfläche der Submukosa mit den Darmbakterien münden könnte. Dadurch könnte eine verstärkte Entzündung hervorgerufen werden. Es wird unter anderem beschrieben, dass die Induktion des Hitzeschockproteins 70 (HSP70) intestinale Epithelzellen vor Verletzungen schützt (Musch et al., 1996). Ito et al. zeigten, dass die Expression des HSP70 in bronchialen Epithelzellen protektiv gegenüber Schädigungen wirkt und damit das Ausbrechen einer Bronchitis verhindert wird (Ito et al., 2006). Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten jedoch, dass BPI keinen Einfluss auf die Expression von HSP70 während einer DSS-induzierten Kolitis hat. Die Expression von HSP70 war sowohl im WT als auch in BPI^{-/-}-Mäusen gleich hoch und identisch reguliert (Abb. 4-8).

Einen weiteren Grund für den stärkeren Verlauf der Kolitis in BPI^{-/-}-Mäusen sollte die Analyse der Zusammensetzung von Entzündungszellen im Darmepithel liefern. Die gesteigerte Einwanderung von Immunzellen in die betroffenen Gewebe ist ein

typisches Merkmal für die Stärke und Schwere einer Entzündung. Durch die unterschiedliche Suzeptibilität gegenüber der DSS-induzierten Kolitis lassen sich verschiedene Zusammensetzungen bezüglich der Anzahl von Entzündungszellen vermuten. Möglicherweise kommt es durch die stärkere Infiltration einer bestimmten Zellpopulation in dem Darm von BPI^{-/-}-Mäusen zu einer überschießenden Immunreaktion.

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten bei den BPI^{-/-}-Mäusen eine deutlich erhöhte Anzahl von allen untersuchten Entzündungszellen (Abb. 4-9 / Abb. 4-10). So konnten sowohl mehr Makrophagen, als auch T- und B-Zellen nachgewiesen werden. Eine überschießende Entzündungsreaktion kann unter anderem durch einen Überschuss an Entzündungszellen verursacht werden (Bouma et al., 2003).

Neben der Infiltration von Immunzellen ins Gewebe wäre ebenfalls ein Wachstum von Immunzellen im Entzündungsgewebe möglich, welches zum Phänotyp der vermehrten Detektion von Immunzellen beiträgt. Zum Beispiel könnte das Fehlen der Expression von BPI dazu führen, dass bakterielle Bestandteile wie z.B. LPS nach der Zerstörung des Darmepithels durch die DSS-Gabe nicht mehr neutralisiert werden können und dadurch zu einer gesteigerten Proliferation von Entzündungszellen im Darm führen. Dies bestätigten Proliferationsanalysen von B-Zellen, die zeigten, dass BPI in der Lage ist, die B-Zell-Proliferation zu inhibieren (Abb. 4-12). Des Weiteren ist es aber auch denkbar, dass die gesteigerte Anzahl an Entzündungszellen mit der stark erhöhten IL-1 β -Konzentration zusammenhängt, da das proinflammatorische Zytokin zum einen in der Lage ist, die Proliferation von Immunzellen zu stimulieren als auch durch seine chemotaktische Eigenschaft Immunzellen anzulocken (Howard et al., 1983; Marks et al., 2006). Wahrscheinlich ist ein Zusammenspiel zwischen der erhöhten Anzahl der Entzündungszellen und der gesteigerten Synthese von IL-1 β für die beobachtete Pathogenese verantwortlich.

5.4 BPI-Defizienz hat keinen Einfluss auf den IL-17C Signalweg

Die IL-17-Familie besteht aus sechs verschiedenen Mitgliedern, IL-17A – IL-17F, welche von verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. Unter anderem lassen sie sich in zahlreichen Geweben wie Niere, Lunge, Haut, hämatopoetischem Gewebe und Darm nachweisen (Moseley et al., 2003). Sie sind in der Lage, die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen sowie antimikrobiellen Peptiden zu induzieren. Die IL-17 Familie nimmt auch eine wichtige Funktion bei der mukosalen

Immunabwehr ein (Ramirez-Carrozzi et al., 2011). Arbeiten zeigen, dass das Fehlen von IL-17A zu einer gesteigerten Entzündung nach DSS-induzierter Kolitis führt. Im Gegensatz dazu zeigten IL-17F-defiziente Mäuse einen protektiven Effekt gegenüber der induzierten DSS-Kolitis (Yang et al., 2008). Auch IL-17C wird in Zusammenhang mit dem mukosalen Immunsystem assoziiert. Song et al. identifizierten IL-17C als Mediator für proinflammatorische Genexpression in Epithelzellen und zeigten, dass bei Infektionen mit *Citrobacter rodentium* IL-17C stark hochreguliert wurde (Song et al., 2011). Eine weitere Studie demonstriert, dass IL-17C-defiziente Mäuse suszeptibler gegenüber einer DSS-induzierten Kolitis sind (Reynolds et al., 2013). Auch in dieser Arbeit zeigte sich, dass die mRNA-Expression von IL-17C durch DSS-Gabe in WT-Mäusen induziert wird (Abb. 4-13). Da auch in den BPI-defizienten Mäusen IL-17C während einer Kolitis verstärkt exprimiert wurde, kann ausgeschlossen werden, dass BPI einen Einfluss auf IL-17C hat und somit diesen Signalweg der mukosalen Immunabwehr nicht beeinträchtigt.

5.5 BPI-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Mikroflora

Die Mikrobiota scheinen bei CED eine wichtige Rolle zu spielen. So wird eine Dysregulation der intestinalen Mikroflora als ein weiterer Aspekt der Ätiologie von CED angenommen. Die Expression von AMPs hat für das Gleichgewicht der Mikroflora und die mukosale Abwehr eine entscheidende Bedeutung. So wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt, dass sowohl das Fehlen als auch die Anwesenheit zusätzlicher AMPs die Zusammensetzung der Mikroflora modifizieren kann. Salzmann et al. zeigten in einer Studie, dass in Mäusen denen die Matrixmetalloproteinase 7 fehlt, welche für die Aktivierung der α -Defensine verantwortlich ist, signifikant mehr *Firmicutes* und weniger *Bacteroidetes* nachweisbar sind. Dahingegen waren in HD5 transgenen Mäusen, welche das humane α -Defensin 5 in Panethzellen exprimieren, signifikant weniger *Firmicutes* und mehr *Bacteroidetes* nachweisbar. Diese gestörte Ratio zwischen *Firmicutes* und *Bacteroidetes* führt sowohl bei Tieren als auch beim Menschen zur Adipositas (Salzmann et al., 2010).

Diese Arbeiten zeigen, welchen zentralen Einfluß AMPs auf die Zusammensetzung des enteralen Mikrobioms einnehmen. Deshalb haben wir die Hypothese aufgestellt, dass möglicherweise auch BPI einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Mikrobiota haben könnte und dies ein möglicher Grund für die erhöhte Suzeptibilität

der BPI-defizienten Mäuse bei einer DSS-induzierten Kolitis ist. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied in den hier untersuchten Bakterienordnungen zwischen WT- und BPI^{-/-} - Mäusen gefunden werden (Abb. 4-14). Allerdings wurden im Rahmen der durchgeführten Mikrobiomanalyse nur drei verschiedene Bakterienordnungen analysiert. Der Gastrointestinaltrakt beherbergt allerdings über 500 verschiedene Bakterienarten, wobei sich hauptsächlich fünf dominante Bakterienordnungen nachweisen lassen: *Bacteroidales*, *Bifidobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridiales* und *Lactobacillales*. Die hier untersuchten Mikroorganismen gehören zu den Ordnungen *Bacteroidales*, *Clostridiales* und *Lactobacillales* und umfassen über 80% der Gesamtbakterienmenge in der Darmflora von Mäusen (Salzman et al., 2002). Ausserdem wurde in diesen Ordnungen ein starker Einfluss von AMPs auf die Bakterienzahl innerhalb der Ordnung festgestellt (Salzman et al., 2010).

Es ist aber nicht auszuschließen, dass BPI Einfluss auf einzelne bestimmte Bakterienarten nimmt, die in der Betrachtung der Bakterienordnung, wie hier vorgenommen, verloren gehen. Veränderungen bei der Zusammenstellung dieser Bakterien könnten sich dann auf den Verlauf einer DSS-induzierten Kolitis auswirken. Dies sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

5.6 Ausblick

Die hier durchgeführten Experimente zeigen, dass BPI bei der DSS-induzierten Kolitis eine entscheidende Rolle spielt. Dies lässt sich zum einen aus der gesteigerten Expression von BPI während einer Kolitis schließen, als auch durch die stark erhöhte Suszeptibilität BPI-defizienter Mäusen.

Um die Bedeutung von BPI bei Chronisch-entzündlichen-Darmerkrankungen weiter aufzuklären, sollten in Zukunft weitere Aspekte bearbeitet werden.

Die Untersuchungen zur Zusammensetzung der Mikroflora sollten mit sensibleren Nachweismethoden intensiviert werden. Möglicherweise liefert die Methode des *Deep sequencing* ein eindeutigeres Ergebnis, ob sich das Mikrobiom der BPI-defizienten Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen unterscheidet. Mit dieser Technik werden alle Bakterienarten analysiert. In dieser Arbeit wurde sich nur auf die Analyse von vier Bakterienordnungen bzw. -unterordnungen mit Hilfe der Echt-Zeit-PCR konzentriert.

Um den Einfluss von BPI auf die Zusammensetzung der Mikroflora und damit auf die Ausprägung der Kolitis weiter zu klarifizieren, könnte das DSS-Modell auch mit keimfreien BPI-defizienten Mäusen durchgeführt werden. Diese Mäuse bieten die Möglichkeit, sie mit definierten Bakterienarten oder Bakterien aus dem Faeces von Wildtyp-Mäusen zu kolonisieren.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente könnten mit Hilfe einer transgenen Maus wiederholt werden. Durch die Überexpression von BPI im Darm ließe sich möglicherweise einen Schutz der Mäuse vor der Kolitis induzieren und somit die Bedeutung von BPI bei CED genauer klären.

Um zu untersuchen, ob das Fehlen von BPI zu einer verstärkten Zerstörung der Darmbarriere führt, könnte die intestinale Permeabilität *in vivo* zum Beispiel mit Hilfe von FITC-konjugiertem Dextran bestimmt werden. Dazu könnte die Serumkonzentration von FITC nach DSS-induzierter Kolitis gemessen werden. Zusätzlich wären vergleichende Fluoreszenz-basierte *in situ* Hybridisierungen (FISH) des Darmepithels von Wildtyp- und BPI-defizienten Mäusen mit Sonden, die bakterielle 16S rRNA erkennen, denkbar, welche die verstärkte Überbrückung der Epithelbarriere durch Bakterien anzeigen könnten.

6 Zusammenfassung

Das Antimikrobielle Protein (AMP) Bactericidal / Permeability - Increasing Protein (BPI), welches in der Lage ist, Lipopolysaccharide (LPS) effektiv zu binden und damit zu neutralisieren, spielt bei Erkrankungen wie z.B. cystischer Fibrose eine entscheidende Rolle. Allerdings ist bisher unklar, welche Bedeutung BPI für Chronisch-entzündliche-Darmerkrankungen (CED) hat.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass BPI eine wichtige Funktion bei der DSS-induzierten Kolitis einnimmt. Dabei konnte in Wildtyp (WT) - Mäusen eine gesteigerte BPI-Expression während einer DSS-induzierten Kolitis nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Phänotypen von WT- und BPI defizienten (BPI^{-/-}) - Mäusen zeigten sich deutliche Unterschiede im Krankheitsverlauf. Die Defizienz von BPI führte zu einer gesteigerten Suszeptibilität in Mäusen nach DSS-Gabe. Nähere Untersuchungen dazu zeigten, dass BPI^{-/-} - Mäuse mit einer stärkeren Immunantwort reagieren. Diese ist durch eine gesteigerte Zytokinfreisetzung von IL-1 β und eine signifikant erhöhte Anzahl von Entzündungszellen im Darm gekennzeichnet. Bei den Entzündungszellen im Darm handelt es sich um T- und B-Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Erste mechanistische Analysen zeigten, dass BPI weder Einfluss auf intrinsische zytoprotektive Eigenschaften des Epithels hat, noch einen direkten Einfluss auf den IL17C Signalweg nimmt. IL-17C wird eine entscheidende Funktion bei der mukosalen Immunabwehr zugeschrieben.

Auch die Analysen zur Zusammensetzung der Mikroflora im Darm von WT- als auch BPI^{-/-} - Mäusen mittels quantitativer PCR lieferten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. BPI scheint demzufolge keinen direkten Einfluss auf die Zusammensetzung der untersuchten Mikrobiota zu haben, was jedoch durch weitere detaillierte Analysen der Bakterienarten klarifiziert werden sollte.

7 Summary

The Lipopolysaccharid binding and neutralizing antimicrobial protein bactericidal / permeability - increasing protein (BPI) plays an important role in different diseases like for example cystic fibrosis.

However, its role during inflammatory bowel disease is not clear.

With this work we provided evidence that BPI determines the susceptibility of mice during DSS-induced colitis. The administration of DSS led to an increased expression of BPI-mRNA in the gut of wildtype mice (WT). Accordingly BPI-deficient (BPI^{-/-}) mice developed a severe colitis after DSS treatment whereas WT mice were only mildly effected. Detailed analysis demonstrated that BPI^{-/-} mice displayed a stronger immune response characterized by an enhanced cytokine secretion and a significant increased number of inflammatory cells in the effected gut. This was signified by a heightened IL-1 β production from the intestine as well as an enhanced number of macrophages, neutrophilic granulocytes, T-and B- cells in the inflamed gut of BPI^{-/-} mice.

First mechanistic investigations showed that BPI neither has an influence on the intrinsic cytoprotective properties of the gut epithelium nor does it control the IL-17C signaling pathway. IL-17C is thought to be decisive for the mucosal immune defense.

Additionally, the analysis of the composition of the microbiota by quantiative PCR did not reveal any significant differences between the two genotypes analyzed. Therefore, BPI seems to have not a strong impact on the composition of the microbiota but this has to be clarified in future analysis in more details.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>copy DNA</i> (komplementäre DNA)
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxy ribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat(e)
ECM	<i>extracellular matrix</i> (extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FKS	fötales Kälberserum
fw	<i>forward</i> (vorwärts)
g	Gramm
h	<i>hour</i> (Stunde)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
Ko	Kontrolle

l	Liter
m	milli
mA	Milliampere
mCrp4	<i>mouse Cryptdin 4</i>
M	molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
MIB	<i>mouse intestinal bacteria</i>
MIP2	<i>macrophage inflammatory protein 2</i>
mk	monoklonal
mL	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
n	nano
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	nanomolar
OD	optische Dichte
p.a.	<i>pro analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBS	<i>phosphate-buffered-saline</i> (Phosphat-gepufferte Lösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pk	polyklonal
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> Polymerasekettenreaktion
rev	<i>reverse</i> (rückwärts)
RIPA	<i>modified radioimmunoprecipitation</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Zellkulturmedium, benannt nach dem <i>Roswell Park Memorial Institute</i>

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse</i> Transkription Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>SFB</i>	<i>segmented filamentous bacteria</i>
S/P	Streptomycin/Penicillin
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Schematische Darstellung des mukosalen Immsystems (Abreu, 2010).....	4
Abb. 1-2 Schematische Darstellung einiger TLRs und ihre Liganden.....	5
Abb. 1-3 Schematische Struktur des Lipopolysaccharid (Rensing, 2003).....	10
Abb. 1-4 Struktur und Funktion von BPI (modifiziert nach Schultz and Weiss 2007)	11
Abb. 4-1 Expression von mBPI nach Stimulation in mIC _{cl2} -Zellen	35
Abb. 4-2 mCrp4-Expression nach Stimulation von Epithelzellen.....	37
Abb. 4-3 Erhöhte mBPI-Expression im Colon während einer DSS-Kolitis in WT-Mäusen.....	38
Abb. 4-4 BPI ^{-/-} -Mäuse entwickeln stärkere Symptome einer DSS-Kolitis als WT-Mäuse.....	40
Abb. 4-5 H&E-Färbungen des Colon von WT- und BPI ^{-/-} -Mäusen.....	41
Abb. 4-6 Zytokinproduktion während DSS-Kolitis in WT- und BPI ^{-/-} -Mäusen	42
Abb. 4-7 Erhöhte mCrp4-Expression in BPI-defizienten Mäusen	43
Abb. 4-8 HSP70-Expression während DSS-Kolitis in WT- und BPI ^{-/-} -Mäusen.....	44
Abb. 4-9 Immunhistochemische Färbung des Colon von WT und BPI ^{-/-} Mäusen.....	45
Abb. 4-10 Immunhistochemische Färbung des Colon von WT und BPI ^{-/-} Mäusen.....	46
Abb. 4-11 Erhöhte Anzahl von B-Zellen in BPI ^{-/-} -Mäusen.....	47
Abb. 4-12 BPI neutralisiert LPS und inhibiert B-Zell-Proliferation	48
Abb. 4-13 BPI hat keinen Einfluss auf die IL17C-mRNA-Synthese	49
Abb. 4-14 BPI Defizienz hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Mikroflora.....	50

10 Literaturverzeichnis

Abreu, M. T. (2010). "Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function." *Nat Rev Immunol* 10(2): 131-44.

Aichele, D., M. Schnare, et al. (2006). "Expression and antimicrobial function of bactericidal permeability-increasing protein in cystic fibrosis patients." *Infect Immun* 74(8): 4708-14.

Akin, H., G. Tahan, et al. (2013). "Association between bactericidal/permeability increasing protein (BPI) gene polymorphism (Lys216Glu) and inflammatory bowel disease." *J Crohns Colitis* 5(1): 14-8.

Arai, Y., H. Takanashi, et al. (1998). "Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice." *Cytokine* 10(11): 890-6.

Artis, D. (2008). "Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut." *Nat Rev Immunol* 8(6): 411-20.

Ayabe, T., T. Ashida, et al. (2004). "The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense." *Trends Microbiol* 12(8): 394-8.

Ayabe, T., D. P. Satchell, et al. (2000). "Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria." *Nat Immunol* 1(2): 113-8.

Baumgart, D. C. and A. U. Dignass (2002). "Intestinal barrier function." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5(6): 685-94.

Becker, J. and E. A. Craig (1994). "Heat-shock proteins as molecular chaperones." *Eur J Biochem* 219(1-2): 11-23.

Benckert, J., N. Schmolka, et al. (2011). "The majority of intestinal IgA⁺ and IgG⁺ plasmablasts in the human gut are antigen-specific." *J Clin Invest* 121(5): 1946-55.

Bouma, G. and W. Strober (2003). "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease." *Nat Rev Immunol* 3(7): 521-33.

Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" *Nat Rev Microbiol* 3(3): 238-50.

Canny, G., E. Cario, et al. (2006). "Functional and biochemical characterization of epithelial bactericidal/permeability-increasing protein." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(3): G557-67.

Canny, G., O. Levy, et al. (2002). "Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6): 3902-7.

Cappello, M., S. Keshav, et al. (1992). "Detection of mRNAs for macrophage products in inflammatory bowel disease by in situ hybridisation." *Gut* 33(9): 1214-9.

Casini-Raggi, V., L. Kam, et al. (1995). "Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation." *J Immunol* 154(5): 2434-40.

Cederlund, A., G. H. Gudmundsson, et al. (2011). "Antimicrobial peptides important in innate immunity." *Febs J* 278(20): 3942-51.

Chassaing, B. and A. Darfeuille-Michaud (2011). "The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases." *Gastroenterology* 140(6): 1720-28.

Dinarello, C. A. (1996). "Biologic basis for interleukin-1 in disease." *Blood* 87(6): 2095-147.

Donskey, C. J., A. M. Hujer, et al. (2003). "Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients." *J Microbiol Methods* 54(2): 249-56.

Elsbach, P. and J. Weiss (1998). "Role of the bactericidal/permeability-increasing protein in host defence." *Curr Opin Immunol* 10(1): 45-9.

Fearon, D. T. and R. M. Locksley (1996). "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response." *Science* 272(5258): 50-3.

Feder, M. E. and G. E. Hofmann (1999). "Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology." *Annu Rev Physiol* 61: 243-82.

Fiocchi, C. (1998). "Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis." *Gastroenterology* 115(1): 182-205.

Fukata, M., A. S. Vamadevan, et al. (2009). "Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders." *Semin Immunol* 21(4): 242-53.

Hartmann, G., C. Bidlingmaier, et al. (2000). "Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice." *J Pharmacol Exp Ther* 292(1): 22-30.

Henckaerts, L., C. Figueroa, et al. (2008). "The role of genetics in inflammatory bowel disease." *Curr Drug Targets* 9(5): 361-8.

Ho, S., C. Pothoulakis, et al. (2013). "Antimicrobial peptides and colitis." *Curr Pharm Des* 19(1): 40-7.

Hornef, M. W., T. Frisan, et al. (2002). "Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells." *J Exp Med* 195(5): 559-70.

Howard, M., S. B. Mizel, et al. (1983). "Role of interleukin 1 in anti-immunoglobulin-induced B cell proliferation." *J Exp Med* 157(5): 1529-43.

Iimura, M., R. L. Gallo, et al. (2005). "Cathelicidin mediates innate intestinal defense against colonization with epithelial adherent bacterial pathogens." *J Immunol* 174(8): 4901-7.

Isolaure, S. S., A. Ouwehand (2004). "Probiotics." *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 18(2): 299-313.

Ito, H., K. Sekimura, et al. (2006). "[Cytoprotective effects of heat shock protein-70 in bronchial epithelium against neutrophil elastase-induced cell injury]." *Atherosclerosis* 193(2): 820-6.

Janeway, C. A. T., P.; Walport, M.; Shlomchik, M. (2002). *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer (Heidelberg).

Kamdar, K., V. Nguyen, et al. (2013). "Toll-like receptor signaling and regulation of intestinal immunity." *Virulence* 4(3): 207-12.

Kawai, T. and S. Akira (2006). "TLR signaling." *Cell Death Differ* 13(5): 816-25.

Khor, B., A. Gardet, et al. (2011). "Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Nature* 474(7351): 307-17.

Kitajima, S., S. Takuma, et al. (2000). "Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights." *Exp Anim* 49(1): 9-15.

Kobayashi, K., N. Inohara, et al. (2002). "RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems." *Nature* 416(6877): 194-9.

Kregel, K. C. (2002). "Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance." *J Appl Physiol* 92(5): 2177-86.

Lees, C. W., J. C. Barrett, et al. (2011). "New IBD genetics: common pathways with other diseases." *Gut* 60(12): 1739-53.

Lennartsson, A., K. Pieters, et al. (2005). "A murine antibacterial ortholog to human bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is expressed in testis, epididymis, and bone marrow." *J Leukoc Biol* 77(3): 369-77.

Liew, F. Y., D. Xu, et al. (2005). "Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses." *Nat Rev Immunol* 5(6): 446-58.

Ludwig, D., M. Stahl, et al. (1999). "Enhanced intestinal expression of heat shock protein 70 in patients with inflammatory bowel diseases." *Dig Dis Sci* 44(7): 1440-7.

Macdonald, T. T. and G. Monteleone (2005). "Immunity, inflammation, and allergy in the gut." *Science* 307(5717): 1920-5.

Magalhaes, J. G., I. Tattoli, et al. (2007). "The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens." *Semin Immunol* 19(2): 106-15.

Malago, J. J., J. F. Koninkx, et al. (2002). "The heat shock response and cytoprotection of the intestinal epithelium." *Cell Stress Chaperones* 7(2): 191-9.

March, C. J., B. Mosley, et al. (1985). "Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs." *Nature* 315(6021): 641-7.

Marks, D. J., M. W. Harbord, et al. (2006). "Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation." *Lancet* 367(9511): 668-78.

Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immune recognition: mechanisms and pathways." *Immunol Rev* 173: 89-97.

Moseley, T. A., D. R. Haudenschild, et al. (2003). "Interleukin-17 family and IL-17 receptors." *Cytokine Growth Factor Rev* 14(2): 155-74.

Mowat, A. M. (2003). "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens." *Nat Rev Immunol* 3(4): 331-41.

- Musch, M. W., M. J. Ciancio, et al. (1996). "Induction of heat shock protein 70 protects intestinal epithelial IEC-18 cells from oxidant and thermal injury." *Am J Physiol* 270(2 Pt 1): C429-36.
- Ni, J., S. F. Chen, et al. (1996). "Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes." *Gut* 39(2): 234-41.
- Ogura, Y., D. K. Bonen, et al. (2001). "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease." *Nature* 411(6837): 603-6.
- Okayasu, I., S. Hatakeyama, et al. (1990). "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." *Gastroenterology* 98(3): 694-702.
- O'Neil, D. A., E. M. Porter, et al. (1999). "Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium." *J Immunol* 163(12): 6718-24.
- O'Neill, L. A. (2006). "How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know." *Curr Opin Immunol* 18(1): 3-9.
- Ouellette, A. J. and M. E. Selsted (1996). "Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense." *Faseb J* 10(11): 1280-9.
- Papadakis, K. A. and S. R. Targan (1999). "Current theories on the causes of inflammatory bowel disease." *Gastroenterol Clin North Am* 28(2): 283-96.
- Podolsky, D. K. (2002). "Inflammatory bowel disease." *N Engl J Med* 347(6): 417-29.
- Pone, E. J., Z. Xu, et al. (2012). "B cell TLRs and induction of immunoglobulin class-switch DNA recombination." *Front Biosci* 17: 2594-615.
- Rahman, A., A. Fahlgren, et al. (2011). "Chronic colitis induces expression of beta-defensins in murine intestinal epithelial cells." *Clin Exp Immunol* 163(1): 123-30.

Rahman, A., A. Fahlgren, et al. (2011). "Chronic colitis induces expression of beta-defensins in murine intestinal epithelial cells." *Clin Exp Immunol* 163(1): 123-30.

Ramirez-Carrozzi, V., A. Sambandam, et al. (2011). "IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner." *Nat Immunol* 12(12): 1159-66.

Reimund, J. M., C. Wittersheim, et al. (1996). "Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease." *J Clin Immunol* 16(3): 144-50.

Rensing, H. (2003). "[Endotoxins. Pathogenetic meaning of sepsis]." *Anaesthesist* 52 Suppl 1: S7-S13.

Reynolds, J. M., G. J. Martinez, et al. (2012) "Cutting edge: regulation of intestinal inflammation and barrier function by IL-17C." *J Immunol* 189(9): 4226-30.

Salzman, N. H., et al. (2002) "Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria." *Microbiology*. 148:3651–3660.

Salzman, N. H., K. Hung, et al. (2010) "Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology." *Nat Immunol* 11(1): 76-83.

Salzman, N. H., M. A. Underwood, et al. (2007). "Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa." *Semin Immunol* 19(2): 70-83.

Sansonetti, P. J. (2004). "War and peace at mucosal surfaces." *Nat Rev Immunol* 4(12): 953-64.

Scaldaferri, F. and C. Fiocchi (2007). "Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis." *J Dig Dis* 8(4): 171-8.

Schultz, H. and J. P. Weiss (2007). "The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease." *Clin Chim Acta* 384(1-2): 12-23.

Solomon, M., Mallon, Donnelly, Hoper, Loughrey, Kirk, Gardiner (2010). "The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview." *Comparativ Clinical Pathology* 19(3): 235-239.

Stoffel, M. P., E. Csernok, et al. (1996). "Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against bactericidal/permeability increasing protein (BPI): a new seromarker for inflammatory bowel disease and associated disorders." *Clin Exp Immunol* 104(1): 54-9.

Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." *Int Immunol* 17(1): 1-14.

Traskalova-Hogenova, H., R. Stepankova, et al. (2004). "Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases." *Immunol Lett* 93(2-3): 97-108.

Villegas, I., C. Alarcon de la Lastra, et al. (2003). "A new flavonoid derivative, dosmalfate, attenuates the development of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice." *Int Immunopharmacol* 3(13-14): 1731-41.

Wehkamp, J., K. Fellermann, et al. (2002). "Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14(7): 745-52.

Wehkamp, J., K. Fellermann, et al. (2005). "Human defensins in Crohn's disease." *Chem Immunol Allergy* 86: 42-54.

Wehkamp, J., N. H. Salzman, et al. (2005). "Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(50): 18129-34.

Weiss, J., P. Elsbach, et al. (1978). "Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes." *J Biol Chem* 253(8): 2664-72.

Wells, J. M., O. Rossi, et al. (2011). "Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1: 4607-14.

Werts, C., S. Rubino, et al. (2011). "Nod-like receptors in intestinal homeostasis, inflammation, and cancer." *J Leukoc Biol* 90(3): 471-82.

Yang, X. O., S. H. Chang, et al. (2008). "Regulation of inflammatory responses by IL-17F." *J Exp Med* 205(5): 1063-75.

11 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg:

Andreesen, Behrens, Blume, Bonas, Bordusa, Breunig, Dorn, Drygalla, Faust, Ferenz, Fischer, Golbik, Hansmann, Hatzfeld, Hauser, Hartrodt, Hübner, Kappler, Klösger, König, Krauss, Marques, Moritz, Meyer, Neubert, Nies, Ostareck, Rudolph, Schiene-Fischer, Schlosser, Schmidt, Schwarz, Seliger, Starkloff, Stölzer, Stubbs, Thondorf, Tittmann, Ulbrich-Hofmann, Vogt, Wahle, Wasternack, Weinert